



**SOLICITUD DE TÉRMINO
DE SERVICIO SOCIAL**

Mtra. María Elena Contreras Garfias
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
PRESENTE

Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
	12	4	2021		12	10	2021

Datos del Alumno

Nombre : CHRISTIAN EDUARDO MORENO ALVAREZ	
Matrícula : 2163066351	Licenciatura : Química Farmacéutica Biológica <input type="checkbox"/>
Domicilio : Avenida 6 #210 col. Ignacio Zaragoza CP. 15000, Del. Venustiano Carranza, CDMX, México.	
Teléfono : 5588934047	Celular : 5554734712
Correo Electrónico : cris.alvarez.2095@gmail.com	CURP : MOAC950920HDFRLH07

Datos del Proyecto

Nombre del Proyecto : RECOPIACIÓN BIBLIOGRAFICA DE LAS PRUEBAS DE LABORATORIO UTILIZADAS PARA EL DIAGNOSTICO DE BRUCELOSIS EN HUMANOS.							
Lugar donde se realizó el Servicio Social : DIRECCIÓN GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA (INSTITUTO DE DIAGNOSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLOGICOS)							
Dependencia : SECRETARIA DE SALUD							
Entidad Federativa : Distrito Federal							
Municipio : ALVARO OBREGON	Localidad : LOMAS DE PLATEROS						
Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año
	12	4	2021		12	10	2021

PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

Sector: 3.- Público <input type="checkbox"/>	Tipo: 1.- Externo <input type="checkbox"/>
Orientación: 8.- Salud, Alimentación Y Nutrición <input type="checkbox"/>	

FIRMAS

M. en C. Felipe Mendoza Pérez

Asesor Interno
Nombre, firma y No. Económico

CHRISTIAN EDUARDO MORENO ALVAREZ

Alumno
Nombre, firma

Q.B.P. EDUARDO JIMENEZ SANCHEZ 10571361

Asesor Externo
Nombre, firma y No. Económico

M. en C. Felipe Mendoza Pérez

Vo. Bo. de la Comisión
Nombre y firma de la persona que autoriza



SALUD

SECRETARÍA DE SALUD

Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud
Dirección General de Epidemiología
Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
"Dr. Manuel Martínez Báez" (InDRE)

CARTA TÉRMINO SERVICIO SOCIAL

Ciudad de México, a 12 de octubre de 2021

DR. JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
PRESENTE

Por este conducto hacemos constar que el alumno **MORENO ALVAREZ CHRISTIAN EDUARDO**, estudiante de la carrera **Licenciatura Química Farmacéutica Biológica**, con número de matrícula **2163066351**, ha concluido satisfactoriamente su Servicio Social en el Laboratorio de Brucelosis con el proyecto: **"Recopilación Bibliográfica de las Pruebas de Laboratorio Utilizadas para el Diagnóstico de Brucelosis en Humanos"**. En el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos "Dr. Manuel Martínez Báez" (InDRE), con el programa **Sistemas para el Diagnóstico con Impacto en Salud Pública**. Le informo además que el Servicio Social se realizó en un periodo comprendido del **12 de abril al 12 de octubre de 2021**, cubriendo un total de **480 horas efectivas de trabajo**.

ATENTAMENTE

QBP. Eduardo Jiménez Sánchez
Jefe del Laboratorio de Brucelosis
Del InDRE

QFB. Francisco Javier Méndez Pérez
Jefe del Área de Gestión para la
Capacitación del InDRE

C.c.p. Mtra. María Elena Contreras Garfías.- Directora de la DCBS.- UAM-Xochimilco.

Sección/Serie:1s.3

FJMP/ecp*





Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

México, D.F. a 12 de octubre de 2021

Dr. Juan Esteban Barranco Florido
Jefe del Departamento de Sistemas Biológicos
Presente.

Por medio de la presente me permito comunicarle a usted que el alumno: Christian Eduardo Moreno Alvarez con Matrícula 2163066351 concluyó el proyecto de servicio social RECOPIACIÓN BIBLIOGRAFICA DE LAS PRUEBAS DE LABORATORIO UTILIZADAS PARA EL DIAGNOSTICO DE BRUCELOSIS EN HUMANOS. Que se realizó en la DIRECCIÓN GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA (INSTITUTO DE DIAGNOSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLOGICOS) dependencia de la SECRETARIA DE SALUD. Ubicado en Francisco de P. Miranda 177, Lomas de Plateros, Álvaro Obregón, 01480 Ciudad de México, CDMX. Del 12 de abril de 2021 al 12 de octubre de 2021 bajo mi asesoría cubriendo un total de 480 horas.

ATENTAMENTE

M. en C. Felipe Mendoza Pérez

Nombre y firma del asesor

Mtra. María Elena Contreras Garfias

c.c.p. Directora de la División de CBS UAM-X



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA
Unidad Xochimilco

México, D.F. a 12 de octubre de 2021

Dr. Juan Esteban Barranco Florido
Jefe del Departamento de Sistemas Biológicos
Presente.

Por medio de la presente me permito comunicarle a usted que el alumno: Christian Eduardo Moreno Alvarez con Matrícula 2163066351 concluyó el proyecto de servicio social RECOPIACIÓN BIBLIOGRAFICA DE LAS PRUEBAS DE LABORATORIO UTILIZADAS PARA EL DIAGNOSTICO DE BRUCELOSIS EN HUMANOS. Que se realizó en la DIRECCIÓN GENERAL DE EPIDEMIOLOGÍA (INSTITUTO DE DIAGNOSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLOGICOS) dependencia de la SECRETARIA DE SALUD. Ubicado en Francisco de P. Miranda 177, Lomas de Plateros, Álvaro Obregón, 01480 Ciudad de México, CDMX. Del 12 de abril de 2021 al 12 de octubre de 2021 bajo mi asesoría cubriendo un total de 480 horas.

ATENTAMENTE

Q.B.P. Eduardo Jiménez Sánchez

Nombre y firma del asesor

Cédula profesional

10571361

Mtra. María Elena Contreras Garfias

c.c.p. Directora de la División de CBS UAM-X



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

NOMBRE DEL PROYECTO:

Recopilación bibliográfica de las pruebas de laboratorio utilizadas para el diagnóstico de brucelosis en humanos.

PROYECTO GENÉRICO CORRESPONDIENTE:

Evaluación de productos relacionados con la salud.

ETAPA:

Desarrollo de métodos y técnicas analíticas para el control físico, químico, biológico y/o microbiológico de productos relacionados con la salud.

Alumno:

Christian Eduardo Moreno Alvarez

Matricula. 2163066351

Asesores:

Q.B.P. Eduardo Jiménez Sánchez
Ced. Profesional: 10571361

M. en C. Felipe Mendoza Pérez
No. Económico: 7183

Lugar de realización: Francisco de P. Miranda 177, Lomas de Plateros, Álvaro Obregón, 01480 Ciudad de México, CDMX, del 12 de abril de 2021 al 12 de octubre de 2021.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. JUSTIFICACIÓN DE LA ETAPA EN LA QUE SE PARTICIPA.....	1
3. OBJETIVO.....	3
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
5. METODOLOGÍA.....	4
6. Conceptos generales de la brucelosis.....	4
6.1. Antecedentes históricos.....	4
6.2. Especies del género <i>Brucella</i>	6
6.3. Características microbiológicas de <i>Brucella</i>	7
6.3.1. Estructura y composición química de <i>Brucella</i> spp.....	7
7. Rasgos clínicos de la brucelosis en humanos.....	9
7.1. Patogenicidad de <i>Brucella</i> y factores de virulencia.....	9
7.2. Epidemiología.....	12
8. Pruebas utilizadas para la detección y el diagnóstico de brucelosis en humanos.....	13
8.1. Métodos indirectos para la detección de brucelosis (serológicos).....	13
8.1.1. Prueba Rosa de Bengala (RB).....	14
8.1.2. Prueba de aglutinación en tubo (SAT).....	14
8.1.3. Prueba de aglutinación con 2-mercaptoetanol (2-ME).....	15
8.1.4. Prueba de Coombs.....	15
8.1.5. Prueba de inmunoensayo enzimático Indirecto (ELISA-i).....	16
8.1.6. Prueba de inmunoensayo enzimático competitivo (ELISA-c).....	16
8.1.7. Prueba de fluorescencia polarizada (FPA).....	17
8.1.8. Prueba de Inmuncaptura (BRUCCELLACAPT®).....	17
8.1.9. Prueba de inmunodifusión en gel de agarosa (IDGA).....	18
8.1.10. Prueba inmunocromatográfica.....	18
8.2. Método directo para la detección de brucelosis (microbiológicos).....	19
8.2.1. Cultivo de <i>Brucella</i>	20
8.2.2. Identificación microscópica y colonial de <i>Brucella</i>	21
8.2.3. Identificación de la especie y el biovar de <i>Brucella</i>	22
8.3. Técnicas moleculares para la detección de <i>Brucella</i>	24
8.3.1. Prueba molecular (PCR) para la detección de <i>Brucella</i> spp.....	24

8.3.2.	PCR en tiempo real	25
8.3.3.	Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP).....	26
8.3.4.	MALDI-TOF	26
8.3.5.	Aptameros (SELEX)	28
8.3.6.	Secuenciación de nueva generación (NGS).....	29
9.	Tratamientos y reincidencia de la enfermedad	30
10.	Discusión	31
11.	Bibliografía.....	36
12.	ANEXOS	46
12.1.	Anexo 1. Caracteres diferenciales de las especies del género <i>Brucella</i> y sus biotipos.	46
12.2.	Resumen.....	47

1. INTRODUCCIÓN

Aunque en muchos países ya se ha logrado la erradicación total de la brucelosis, en otros continúa siendo una de las enfermedades zoonóticas más importantes. Los casos de brucelosis han ido en aumento, sobre todo en países en vías de desarrollo como es México y aún no se han realizado actualizaciones importantes en las metodologías normalizadas para la prevención y control de la brucelosis en el ser humano.

En los últimos diez años se han desarrollado nuevas metodologías para el diagnóstico de la brucelosis, desde las pruebas serológicas, hasta las pruebas moleculares que incluye la PCR y otras en su ramo que mejoran en tiempo, sensibilidad y especificidad la detección de *Brucella* spp., por lo que se realizó una revisión bibliográfica de las pruebas de laboratorio que pueden ser utilizadas en la identificación de *Brucella* que puedan ayudar a mejorar el diagnóstico de la brucelosis, esta investigación podrá servir para actualizar los programas de capacitación del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos InDRE y de otras instituciones de interés.

2. JUSTIFICACIÓN DE LA ETAPA EN LA QUE SE PARTICIPA

La brucelosis es una de las enfermedades zoonóticas más frecuentes en la mayor parte del mundo. Mientras que en los países desarrollados han logrado con éxito su control o erradicación, en los países en vías de desarrollo continúa siendo un gran problema de salud pública (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2020).

Se señala que cada año se presentan 500.000 nuevos casos de brucelosis humana en todo el mundo (Guzmán et al., 2016). México continúa presentando alta incidencia anual de brucelosis en humanos, por lo que es considerado un país endémico de brucelosis. De acuerdo con la Dirección General de Epidemiología, hasta el mes de diciembre del 2019 se registraron 1,621 casos de brucelosis en México, lo cual indica que hubo un aumento del 28.71% con respecto al año anterior (SINAVE/DGE/Salud, 2019).

La patogenicidad y virulencia de *Brucella* están determinadas por los componentes de la membrana externa de la célula bacteriana: el lipopolisacárido (LPS) antígeno inmunodominante y las proteínas de membrana externa, que hace a las bacterias más resistentes a los factores ambientales. El complejo LPS define a las especies de *Brucella* en fenotipos liso y rugoso; las especies lisas más infectivas para el hombre son *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* (Suárez et al., 2009).

Las principales formas de contagio son el contacto directo con animales enfermos y sus desechos, poca higiene y bioseguridad durante el manejo de ganado (Vega Ariza & Rodríguez, 2008), así como la comercialización y consumo de productos lácteos sin pasteurizar como el queso fresco (Castro et al., 2005). La población de mayor riesgo está conformada por pastores, amas de casa, tablajeros y médicos veterinarios, debido a su cercanía con la fuente de infección (Hernández, 2002).

La brucelosis en los humanos se presenta con diferentes manifestaciones clínicas inespecíficas, incluyendo cuadros asintomáticos en la primera etapa de la enfermedad. Usualmente se presenta como un cuadro febril agudo, afectando a cualquier grupo de edad. Puede confundirse con otras infecciones febriles y recibir tratamiento inadecuado, por lo que la enfermedad podría persistir y manifestarse como una recaída o progresar a una infección crónica localizada. Esta enfermedad compromete a cualquier órgano o tejido del cuerpo, y genera una serie de complicaciones; entre las más comunes están las osteoarticulares, hepatobiliares, de vías respiratorias, genitourinarias, cardiovasculares, neurológicas, cutáneas, y oftálmicas (Alsubaje et al., 2005). Aun cuando se realice el diagnóstico temprano y se prescriba correctamente la terapia, alrededor de 10 a 30% de los pacientes desarrollará brucelosis crónica (Morales et al., 2014).

El diagnóstico se establece mediante métodos directos evidenciando la presencia de la bacteria o de sus componentes en los tejidos de los animales o del hombre. El diagnóstico definitivo requiere el aislamiento de la bacteria, frecuentemente a partir de cultivos de sangre, médula ósea u otros tejidos. Las dificultades propias de la implementación del aislamiento de *Brucella* a partir de los distintos tejidos hacen que los métodos indirectos, que incluyen las pruebas serológicas, sean el recurso

diagnóstico más utilizado por su mayor simpleza y accesibilidad (Castro et al., 2005).

Una de las limitaciones del aislamiento, se debe a que *Brucella* es un microorganismo intracelular facultativo de lento crecimiento y estrictos requerimientos nutricionales, por lo que la probabilidad de recuperarla desde un paciente infectado es baja (alrededor de 30%) y, por otro lado, las pruebas serológicas son útiles en el seguimiento clínico de los pacientes con brucelosis aguda, sin embargo, no son útiles en períodos iniciales de la enfermedad o en casos de brucelosis crónica (Morales et al., 2014), todo esto dificulta en gran parte el diagnóstico de la enfermedad.

En los últimos diez años se han desarrollado nuevas metodologías para el diagnóstico de la brucelosis, desde las aceptadas pruebas serológicas, hasta las pruebas moleculares que no incluye únicamente la PCR, sino otras en su ramo que mejoran en tiempo, sensibilidad y especificidad la detección de *Brucella* spp. En el 2019 se registró un aumento de casos por brucelosis del 22.73% respecto al año anterior (Secretaría de Salud et al., 2019), por lo que se realizó una revisión bibliográfica de las pruebas de laboratorio que pueden ser utilizadas en la identificación de *Brucella* que puedan ayudar a mejorar el diagnóstico de la brucelosis, además, esta investigación podrá servir para actualizar los programas de capacitación del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos InDRE y de otras instituciones de interés.

3. OBJETIVO

Realizar una revisión y recopilación bibliográfica de las pruebas de laboratorio utilizadas en el diagnóstico de brucelosis en humanos.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.-Definir los conceptos generales de la brucelosis y sus antecedentes, tanto históricos como lo que se conoce actualmente de *Brucella* spp.

2.-Documentar y organizar los tipos de pruebas de laboratorio que se utilizan en el diagnóstico de brucelosis en humanos.

3.-Discutir lo más importante de las distintas pruebas evidenciando sus ventajas y desventajas con el fin de mejorar su utilización en el diagnóstico de la enfermedad.

5. METODOLOGÍA

Se realizó una revisión de artículos científicos durante los meses de abril a octubre de 2021 en los idiomas inglés y español, obtenidos de bases de datos como: Pubmed, Scielo, Journal of Medical Microbiology, Free Medical Journals, LILACS, Redalyc, Inbiomed, Dialnet, entre otras que pudieran aportar información clara y precisa sobre *Brucella* spp. y las pruebas de laboratorio utilizadas en el diagnóstico de brucelosis en humanos. Se utilizó el término “*Brucella*”, “Brucelosis en humanos”, “Pruebas de diagnóstico” principalmente y se emplearon artículos publicados en el período del año 2000 a la actualidad, usando publicaciones de años anteriores como aporte a la historia del tema. El desarrollo del tema se agrupó en 5 secciones que comprenden del punto 6 al punto 10 de este documento.

6. Conceptos generales de la brucelosis

6.1. Antecedentes históricos

A David Bruce se le atribuye la identificación de *Brucella* durante su estancia en la isla de Malta, donde fue enviado como cirujano del cuerpo médico de la Armada Real Británica. Malta, es una isla pequeña localizada al centro del Mediterráneo al sur de Italia, al oriente de Túnez y al norte de Libia. Bruce observó casos de una enfermedad que causaba fiebre que alcanzaba los 41 °C en las noches y que se normalizaba en el día. En el hospital de Valetta donde se instaló, Bruce no contaba con laboratorios de investigación; sin embargo, impulsado por el trabajo que Robert Koch había realizado sobre el descubrimiento del bacilo de la tuberculosis, decidió investigar el agente causal de la fiebre de Malta, una enfermedad que era bastante común entre los soldados de la tropa británica (Wyatt, 2013). Comenzó por adquirir

un microscopio, donde observó cocos muy pequeños en el bazo de un soldado que murió a causa de la enfermedad. Posteriormente logró aislar el "micrococo" en 1887.

Él pudo reproducir la enfermedad en monos, quienes mostraron fiebre y algunos de ellos murieron. Bruce nombró a la bacteria con el nombre de *Micrococcus melitensis* (Vassallo,1992). En 1896, *Bang* aisló a la bacteria que generaba aborto en vacas y la nombró *Bacillus abortus*. Posteriormente en 1914 Traum, aisló una bacteria de un aborto de cerdo que posteriormente se nombró *Brucella suis*. En 1918, Alice Evans, estableció una conexión entre *Micrococcus melitensis* y *Bacillus abortus*. Así mismo, la Dra. Evans indicó que esta enfermedad de los animales de crianza no ocasionaría contagio alguno al humano, si se consumiera su leche pasteurizada (Moreno, 2014).

Feusier y Meyers en 1920, nombraron al género *Brucella* en honor a David Bruce, microbiólogo y patólogo escocés que identificó al microorganismo por primera vez. La epidemiología de la fiebre de Malta era desconocida hasta 1905 cuando Temistocles Zammit, uno de los miembros malteses de la Comisión para la Investigación de la Fiebre del Mediterráneo encabezada por el Dr. Bruce, encontró que la leche de cabra era el vehículo que diseminaba la bacteria. Cuando la leche de cabra se eliminó de la dieta de las tropas británicas en Malta, la enfermedad se controló en los soldados (Wyatt, 2013). Hoy en día, a más de 100 años de que Zammit asociara a *Brucella* con la leche de cabra, la fiebre de Malta sigue causando enfermedad tanto en animales como en el hombre en varias regiones del planeta. Sin embargo, países como Canadá, E.U.A., Japón, el norte y centro de Europa, Australia y Nueva Zelandia han logrado erradicar esta enfermedad (Jia & Joyner, 2015; Mancini et al., 2014).

Para el año 1905 en México el Dr. Valenzuela y Dr. Carbajal supusieron que algunos de sus pacientes en la región de Querétaro presentaban síntomas característicos similares a la fiebre de Malta. En 1921 el Dr. Manuel Vergara planteó el problema de la existencia de la enfermedad en el estado de Puebla, confirmada por Dr. Placeres mediante las pruebas serológicas y bacteriológicas necesarias. En 1924 se observó el primer caso de brucelosis en el Distrito Federal, y en 1935 en el estado

de Jalisco. El primer laboratorio especializado en brucelosis fue fundado en 1937 por el Dr. Ruiz Castañeda en el Hospital General de México. Posteriormente en 1939 comienza el aislamiento de *Brucella* spp. en el laboratorio de bacteriología e inmunología del entonces Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (ISET). La creación del Laboratorio de Brucelosis tuvo lugar en 1985 dentro del Departamento de Bacteriología bajo la conducción del Dr. Celso Mosqueira. Actualmente el InDRE cuenta con una Red de laboratorios estatales de salud Pública (LESP) en las 32 entidades federativas con la capacidad técnica para realizar el diagnóstico y detección de casos de Brucelosis.

6.2. Especies del género *Brucella*

Se conoce que las especies de *Brucella* tienen predilección para establecerse en ciertos hospederos, por ejemplo: *B. melitensis* infecta a caprinos, *B. abortus* infecta ganado vacuno, y *B. suis* infecta cerdos. Sin embargo, el hospedero preferencial no es limitativo, ya que, *B. melitensis* puede infectar vacas o cerdos y *B. abortus* podría infectar cabras (Godfroid et al., 2014).

Además de estas tres especies, se identificaron otras más, como: *B. canis* que infecta perros, *B. ovis* que se asocia con la infección de ovinos y *B. neotomae* que se aisló de una rata del desierto. Éstas conforman las seis especies clásicas que componen al género *Brucella*. Sin embargo, en las últimas décadas se han identificado otras especies, entre ellas *B. microti* que se aisló de roedores endémicos de la República Checa en el año 2001, siendo reconocida en 2008 como nueva especie (Scholz et al., 2008).

Después del análisis genético de diferentes aislados procedentes de mamíferos marinos, se propusieron dos nuevas especies: *B. pinnipedialis* y *B. ceti* (Foster et al., 2007). Posteriormente se identificó una nueva especie, denominada *B. inopinata*, la que fue aislada de un implante mamario (Scholz et al., 2010). En 2014 se aisló *Brucella*, de mandriles, a la que se ha propuesto nombrarla *B. papionis* (Whatmore, 2014). Recientemente, a partir de muestras de nódulos linfáticos de zorros rojos en Austria, se aisló una nueva especie la que fue descrita como: *B. vulpis* (Scholz et al., 2016). Por otra parte, se han reportado anticuerpos contra

Brucella en animales silvestres como alces, búfalos, venados y cerdos salvajes (Godfroid, 2005). Por lo que estos animales silvestres se consideran como reservorios de la bacteria.

6.3. Características microbiológicas de *Brucella*

El género *Brucella* está constituido por bacilos cortos con bordes redondeados Gram negativos, pequeños, inmóviles, de crecimiento lento que no poseen cápsulas ni forman esporas. Son observados al microscopio de luz con tamaños de 0,5 a 0,7 μm de diámetro y de 0,5 a 1,5 μm de largo. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C en un pH de 6,6 a 7,4. Son aerobios estrictos, catalasa y oxidasa positivos y pueden crecer en medios con pocos nutrientes, aunque se ve favorecido por medios enriquecidos. A diferencia de muchas otras bacterias, su genoma está constituido por dos cromosomas circulares y carece de plásmidos (Freer et al., 1996; Michaux et al., 1997).

En animales de experimentación se ha reportado que su dosis mínima infectante, va desde 10 hasta 100 bacterias, ya sea por vía aerosoles o por vía subcutánea (Swai & Schoonman, 2009). Debido a su capacidad de formar fácilmente aerosoles, se encuentra en la lista de bacterias, que pueden ser utilizadas en bioterrorismo, y debido a ello, en algunos países está restringido trabajar con *Brucella*, tanto en laboratorios clínicos, de investigación o en los que se realiza la producción de vacunas para animales (Ponce de León, 2001; Traxler et al., 2013). De acuerdo con los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de Atlanta, E.U.A., *Brucella* debe manipularse en laboratorios de bioseguridad nivel 3 o laboratorios de bioseguridad nivel 2 con prácticas LBS3 de acuerdo al análisis de riesgo biológico y el personal que ahí labore deberá ser altamente capacitado (Baron, 2008).

6.3.1. Estructura y composición química de *Brucella* spp.

La membrana extracelular de *Brucella* es rica en fosfatidilcolina, sin embargo, su componente más abundante y mejor estudiado es el lipopolisacárido (LPS), que se conoce también con el nombre de endotoxina. En la figura 1 se presenta un esquema de la estructura del LPS, en donde se distinguen tres regiones: el lípido A,

inserto en la hoja externa de la membrana, un oligosacárido intermedio, llamado núcleo, y el polisacárido O (PSO), también conocido como cadena O, ausente o presente con pocos residuos en el LPS-R (Álvarez et al., 2015).

El lípido A es un glicolípido que contiene glucosamina y diaminoglucosa. En sus grupos amino e hidroxilos presenta sustituciones por ácidos grasos de variada longitud de cadena. El núcleo contiene glucosa, manosa y ácido 3, deoxi-D-mano-2 octulosónico (KDO) y no contiene ni heptosas ni fosfatos. La quinovosamina está presente en el núcleo del LPS-S, pero no en el del LPS-R. El PSO es la porción más distal del LPS. Es un homopolímero lineal compuesto por n-residuos de N-formil perosamina (4,6 dideoxi-4-formamido- α -D-manopiranosilo). La unión entre estos residuos puede ser de dos tipos: α 1-2 o α 1-3, lo que permite diferenciar dos configuraciones alternativas, la A y la M, de mucha importancia en la determinación de las biovariedades, y que se establecen a partir de la alternancia de las uniones entre residuos en el PSO (Álvarez et al., 2015).

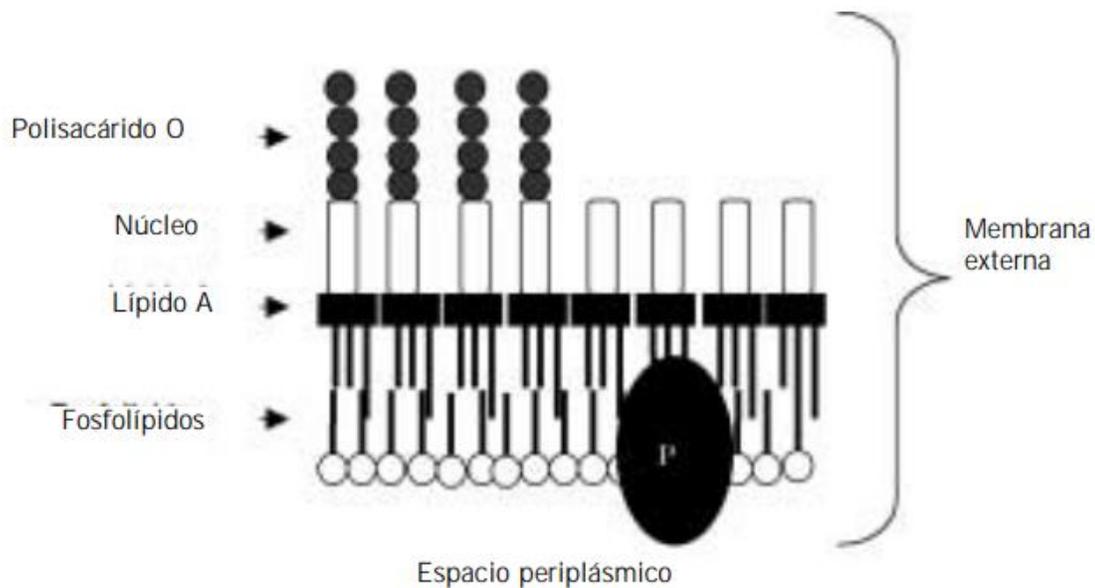


Figura 1. Esquema simplificado de la membrana externa de la pared celular de *Brucella*.

Nota. El LPS-S de las formas lisas está constituido por el lípido A, el núcleo y el polisacárido O (PSO). El LPS-R de las formas rugosas carece, o está reducida a muy pocos residuos, de la cadena O. P: proteínas. Recuperado de Álvarez et al., 2015.

Las proteínas citoplasmáticas de las bacterias del género *Brucella* son específicas de ese género y la mayoría son compartidas por todas las especies (Baldi et al., 1994). Algunas de estas proteínas son de interés diagnóstico, como por ejemplo la glicoproteína A2 termorresistente (Stemshorn & Nielsen, 1981), una proteína de 18 kDa, involucrada en la síntesis de riboflavina, que aparece en la fase activa de la infección (Goldbaum et al., 1999) y la proteína periplásmica BP26 (Seco-Mediavilla et al., 2003).

7. Rasgos clínicos de la brucelosis en humanos

7.1. Patogenicidad de *Brucella* y factores de virulencia

A diferencia de muchas bacterias patógenas intracelulares, *Brucella* no posee los tradicionales factores de virulencia como plásmidos o bacteriófagos lisogénicos que le confieran virulencia, no produce exotoxinas, no tiene cápsula que la proteja de la fagocitosis, ni muestra variación antigénica (Freer et al., 1996).

La patogenicidad y virulencia de *Brucella* están determinadas por los componentes de la membrana externa de la célula bacteriana: el lipopolisacárido (LPS) antígeno inmunodominante y las proteínas de membrana externa, que hace a las bacterias más resistentes a los factores ambientales. El complejo LPS define a las especies de *Brucella* en fenotipos liso y rugoso; las especies lisas más infectivas para el hombre son *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis* (Suárez et al., 2009).

Una característica importante de esta bacteria es su capacidad de residir en el espacio intracelular, por lo que se le considera como una bacteria intracelular facultativa. Esto significa que es capaz de residir dentro de células fagocíticas y no fagocíticas, aunque también puede sobrevivir fuera de las células, y aislarse de la leche cruda o sus derivados (Atluri et al., 2011). Los macrófagos las internalizan dentro de su citoplasma, rodeándolas por un fragmento de la membrana, denominado fagosoma. Una vez dentro, el fagosoma se fusiona con los lisosomas, los que vierten al interior de esta estructura enzimas que tienen como función destruir a las bacterias. El fagosoma también posee un pH ácido que le ayuda a

eliminarlas (Martirosyan et al., 2011). *Brucella* es capaz de evitar la fusión del fagosoma con los lisosomas, además de soportar el pH ácido del fagosoma e incluso, el pH ácido las estimula a producir y secretar proteínas que le permiten sobrevivir y evadir los diversos mecanismos antimicrobianos que poseen los macrófagos (Dorneles et al., 2015).

Durante las primeras 48 h, 90% de la población de *Brucella* que infectan a un humano son eliminadas, pero aquellas que evitan los mecanismos bactericidas de los macrófagos y quedan contenidas en éstos, modifican la señalización intracelular de estas células eucariotas, con lo que logran dirigirse hacia el retículo endoplásmico donde residirán en una vacuola llamada: vacuola contenedora de *Brucella*. De esta forma constituyen el nicho intracelular para su supervivencia a largo plazo, en el que inician su replicación y propagación por todo el organismo, viajando así de célula a célula (Skendros & Boura, 2013).

Brucella tiene mecanismos evolutivos sofisticados para evadir al sistema inmune de los mamíferos que infecta, por lo que, puede causar una enfermedad en un estado latente asintomático con reactivación tardía del sistema inmunológico (Rambow et al., 2009). Durante la etapa aguda, generalmente se desencadenan cuadros febriles ocasionados esencialmente por la respuesta de tipo inflamatoria (producción de citoquinas proinflamatorias). Desde las primeras dos semanas se pueden detectar anticuerpos contra *Brucella* spp., siendo del tipo IgM, IgG e IgA. La infección no genera una memoria inmunológica, debido a que la respuesta inmunológica humoral en contra de infecciones intracelulares es limitada y no protectora (Skendros & Boura, 2013). Y aunque los anticuerpos juegan un papel en la resistencia a la infección, el principal mecanismo de eliminación de la bacteria es a través de una respuesta inmunológica celular (Alsubaje et al., 2005).

Se debe tomar en cuenta que la brucelosis en humanos es una enfermedad de evolución aguda generalmente con una duración de 3 meses y de un año o más en casos crónicos, la cual, si no es tratada adecuadamente, presenta riesgos de complicaciones de 20 a 40% de los pacientes, es incapacitante hasta en 20% y tiene

una tasa de letalidad de hasta 2%, principalmente por endocarditis secundaria a *B. melitensis* (Secretaría de Salud et al., 2012)

El hombre adquiere la bacteria, a través del contacto con animales infectados, ya que *Brucella* tiene la capacidad de adherirse y penetrar las conjuntivas o la piel lesionada (Kumar, 2010). Los médicos veterinarios son también, un grupo de alto riesgo de contagio, ya que su trabajo incluye la revisión, atención y vacunación a los animales con brucelosis (Agasthya, 2007). Otro sector con alto riesgo de contagio es el de las personas que manipulan muestras de fluidos biológicos, tanto en laboratorios de diagnóstico clínico como de investigación o de elaboración de vacunas (Ponce et al., 2001). Sin embargo, la vía más común por la que se puede adquirir la bacteria en población abierta es por el consumo de derivados lácteos no pasteurizados: leche cruda y quesos frescos sin pasteurizar, sobre todo de origen caprino y bovino (Mancini et al., 2014; Arnow et al., 1984; Tsou & Mu, 2012). *Brucella* es capaz de sobrevivir en el medio ambiente, fuera del hospedador, por períodos relativamente largos, en la tabla 1 se puede observar una relación de tiempo con algunos lugares de supervivencia de esta bacteria.

Tabla 1. Supervivencia de Brucella en el medio ambiente.

<i>Material</i>	<i>Tiempo de supervivencia</i>
Suelo y estiércol	80 días
Polvo	15-40 días
Leche a temperatura ambiente	2-4 días
Fluidos y secreciones en verano	10-30 minutos
Lanas de depósitos	110 días
Agua a 37 °C y pH 7,5	menos de 1 día
Agua a 8 °C y pH 6,5	más de 57 días
Fetos mantenidos a la sombra	6-8 meses
Descarga vaginal mantenida en hielo	7 meses
Manteca a 8 °C	1-2 meses
Cuero manchado con excremento de vaca	21 días
Paja	29 días
Grasa de ordeño	9 días
Heces bovinas naturales	1-100 días
Tierra húmeda a temperatura ambiente	66 días
Tierra desecada a temperatura ambiente	4 días.

Nota. Recuperado de Castro et al., 2005. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires Buenos Aires, Argentina.

7.2. Epidemiología

Se señala que cada año se presentan 500.000 nuevos casos de brucelosis humana en todo el mundo (Guzmán et al., 2016). La incidencia y prevalencia de la brucelosis tienen importantes variaciones geográficas. Las zonas de mayor prevalencia corresponden a la región del Mediterráneo, Asia occidental, algunas partes de África y América (Estados Unidos, México, Brasil, Perú, Colombia y Argentina). *B. melitensis* es la especie más difundida seguida de *B. abortus* y *B. suis*. (Castro et al., 2005).

México continúa presentando alta incidencia anual de brucelosis en humanos, por lo que es considerado un país endémico de brucelosis. De acuerdo con la Dirección General de Epidemiología, hasta el mes de diciembre del 2019 se registraron 1,663 casos de brucelosis en México, lo cual indica que hubo un aumento del 22.73% con respecto al año anterior (Secretaría de Salud et al., 2019). En la figura 2 se puede observar que, del total de casos de brucelosis, se presentó una mayor incidencia en mujeres que en hombres con un 62.9% y 37.1% respectivamente.

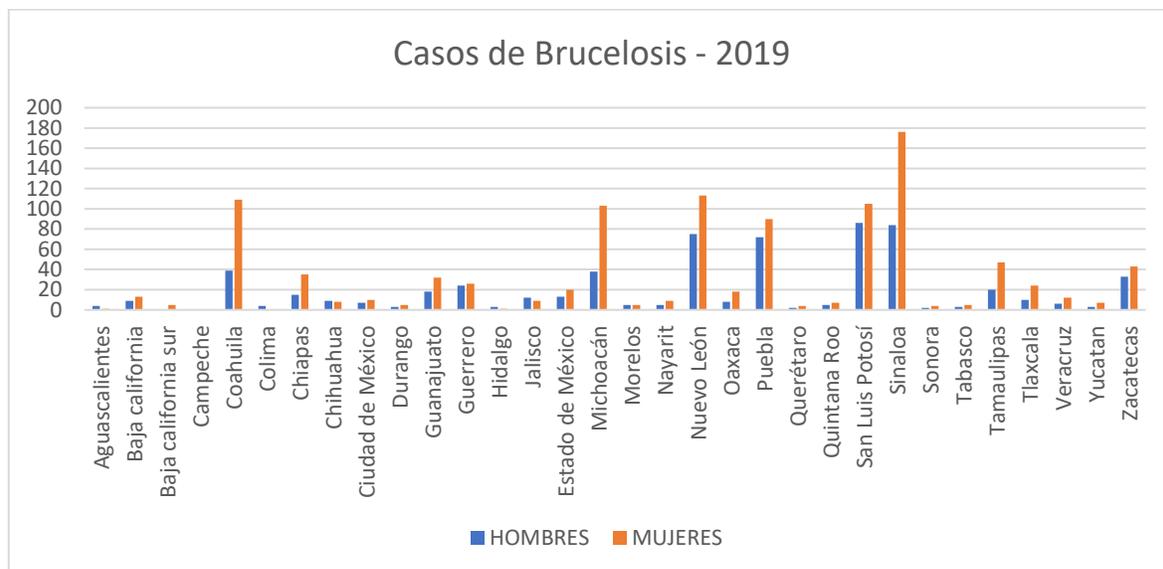


Figura 2. Gráfico de los casos de brucelosis en hombres y mujeres registrados en México en el año 2019.

Nota. Datos obtenidos del boletín epidemiológico de la semana 52 del año 2019. Dirección General de epidemiología, Secretaría de Salud.

También se puede observar que los estados en los que se presentó mayor incidencia de brucelosis figuran dentro de los grandes productores de ganado como San Luis Potosí, Nuevo León y Sinaloa (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), 2020) y productos lácteos como Michoacán, Coahuila y Puebla (SIAP, 2019), lo cual es importante ya que el ganado y los productos lácteos sin pasteurizar son unos de los principales vectores biológicos de *Brucella* (Mancini et al., 2014; Arnow et al., 1984; Tsou & Mu, 2012).

8. Pruebas utilizadas para la detección y el diagnóstico de brucelosis en humanos

El diagnóstico de esta enfermedad se debe basar en la historia clínica del paciente, sobre todo si existió contacto con animales enfermos, si visitó una zona endémica e ingirió derivados lácteos no pasteurizados (Mantur et al., 2016). Este se establece a través de métodos indirectos a partir de muestras serológicas, evidencian anticuerpos específicos contra *Brucella* presentes en los pacientes, posteriormente se deberá confirmar la presencia de *Brucella* spp. mediante métodos directos evidenciando la presencia de la bacteria o de sus componentes en los tejidos del hombre. En los últimos años, debido a los avances en técnicas de diagnóstico basados en la biología molecular, se ha logrado establecer el diagnóstico de forma mucho más precoz y fiable a través de las distintas variantes para amplificar, detectar y secuenciar los ácidos nucleicos (DNA o RNA) en función de la sospecha clínica. Muchas de estas únicamente son de carácter orientativo pues requieren de una estandarización para su utilización (Álvarez et al., 2015), sin embargo, son de gran relevancia para la determinación del tipo de especie infectiva o tratamiento farmacológico efectivo contra *Brucella* spp., por lo que también fueron incluidas para su revisión.

8.1. Métodos indirectos para la detección de brucelosis (serológicos)

La respuesta inmune inducida por *Brucella* en el hombre, se caracteriza por una producción inicial de anticuerpos del isotipo IgM, seguida de la secreción de anticuerpos del isotipo IgG e IgA sérica. El método diagnóstico serológico más

antiguo y aún empleado es la aglutinación de alguno de estos anticuerpos con antígenos de *Brucella*, como el lipopolisacárido liso (S-LPS) que se encuentra en la membrana externa y las proteínas del citosol, que son internas. Por lo que se emplean suspensiones de células de *B. abortus* cepa 1119-3 o 99S, en fase lisa, que son las cepas recomendadas por los organismos internacionales de referencia (Herrera y Cárdenas, 2003). Las pruebas serológicas utilizadas hasta el día de hoy se describen a continuación.

8.1.1. Prueba Rosa de Bengala (RB)

Es una prueba rápida, sensible, cualitativa y semicuantitativa de anticuerpos anti-*Brucella* en suero humano, la cual mucho tiempo fue recomendada por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en brucelosis. Consiste en una aglutinación en porta con *Brucella* estandarizada a una concentración celular del 8 al 12% (para humanos) en una solución reguladora de lactatos a un pH regulador de lactato a un pH de 3.65 ± 0.5 coloreado con rosa de bengala. Cualquier resultado positivo deberá ser confirmado con el cultivo o en su defecto, con las pruebas serológicas complementarias que determinen el tipo de anticuerpo presente, así como el título (Young, 1990). Esta prueba determina anticuerpos de las clases IgM, IgG e IgA aglutinantes en pacientes con brucelosis aguda y crónica, pero no cuantifica los anticuerpos. Se puede obtener un resultado cuantitativo en forma de título realizando diluciones seriadas del suero, pero desde el punto de vista económico este procedimiento es más caro que la aglutinación en tubo (Alton et al., 1988). Es positiva en el 99% de los enfermos que padecen brucelosis o que han tenido contacto previo con el agente y permanece positiva, aún después del tratamiento y la recuperación del enfermo, en algunos casos hasta por años, por lo que, no es de valor diagnóstico en forma aislada.

8.1.2. Prueba de aglutinación en tubo (SAT)

Fue la primera prueba serológica en desarrollarse y desde 1897 es empleada principalmente para el diagnóstico en el mundo. Utiliza como antígeno una suspensión celular fenolada en un pH neutro. Detecta anticuerpos tipo IgG, IgM e IgA y se considera que es útil para diagnosticar infecciones agudas al detectar

anticuerpos clase IgM que ocurren a partir de la primera semana de la enfermedad aguda, aunque se han descrito reacciones cruzadas con otras bacterias (Alton et al., 1988). En México las pruebas de laboratorio están reguladas por la NOM-022-SSA2-2012, esta señala que un título igual o mayor a 1:80 en sueros positivos a RB tiene valor diagnóstico (Secretaría de salud, 2012).

8.1.3. Prueba de aglutinación con 2-mercaptoetanol (2-ME)

Es una variante de la prueba SAT, que emplea un agente reductor (2-mercaptoetanol) para inactivar los anticuerpos IgM presentes en el suero u otros fluidos, el tratamiento permite poner de manifiesto solo aglutininas de los isotipos IgG e IgA. Los títulos mayores que 1/20 se consideran indicativos de brucelosis (Alton et al., 1988). Es una prueba que se correlaciona bien con la evolución clínica de la enfermedad, de modo que, una vez concluida la terapia y en ausencia de síntomas se esperaría que se torne negativa o se presente una disminución paulatina de acuerdo con el título basal. En cambio, los pacientes con recaídas presentan incremento en el título, por lo que se considera un marcador de brucelosis activa. En la brucelosis crónica su utilidad es más limitada, por el tipo de anticuerpos que se inducen.

8.1.4. Prueba de Coombs

Ciertos sueros contienen anticuerpos específicos que se combinan con el antígeno pero que son incapaces de provocar aglutinación; algunos de estos anticuerpos, tal vez por ocupar los puntos de combinación en el antígeno, impiden que las aglutininas provoquen la aglutinación. En la prueba de Coombs se utiliza el reactivo de Coombs para producir la aglutinación en presencia de los anticuerpos llamados incompletos. El reactivo de Coombs es un antisuero específico contra las globulinas del suero que se analiza. En la prueba de Coombs se toma como punto de partida cualquier técnica ordinaria de aglutinación en tubo; en los tubos que no presentan aglutinación se repite la prueba en presencia del reactivo de Coombs.

Un título de 1:40 obtenido mediante la técnica antes descrita significa que el paciente ha padecido un estímulo específico por *Brucella* (Alton et al., 1988). Esta

prueba tiene aplicación práctica en la medicina humana, especialmente para el diagnóstico de la brucelosis crónica, en la que la prueba de Coombs puede dar resultados positivos aun cuando el título de la prueba ordinaria de aglutinación sea bajo o incluso nulo. Una reacción constantemente negativa a la prueba de Coombs en una persona enferma es una prueba indudable de que la brucelosis no es la causa de la enfermedad.

8.1.5. Prueba de inmunoensayo enzimático Indirecto (ELISA-i)

ELISA indirecto es una prueba cualitativa que está diseñada para determinar la presencia de anticuerpos contra especies de *Brucella* (*B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*) provenientes de muestras de suero. La prueba tiene pozos recubiertos con lipopolisacárido (LPS) extraído de *B. abortus*, sobre una matriz sólida, donde cualquier anticuerpo anti *Brucella* presente en la muestra se unirá al LPS. Es una prueba semicuantitativa que está diseñada para determinar la presencia y el título de anticuerpos contra el polisacárido de la cadena O (OPS) de *B. abortus* que se encuentra en pozos con fragmentos de varias longitudes, los anticuerpos contra *Brucella* se unirán al OPS en la placa. La cantidad de color generada es proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-*Brucella* en la muestra (Ellie, 2018).

8.1.6. Prueba de inmunoensayo enzimático competitivo (ELISA-c)

ELISA-c está diseñado para detectar anticuerpos específicos contra brucelosis en muestras de sueros de diferentes especies animales, esta prueba es capaz de medir anticuerpos de clase IgG, aunque éstos se encuentren en muy bajos niveles en el suero y no sean perceptibles por otras pruebas (D'Pool et al., 2004). El procedimiento de la prueba se basa en la reacción de las muestras problema de suero, que contienen o no anticuerpos contra el antígeno lipopolisacárido de *B. abortus* lisa (S-LPS), el cual se encuentra unido al fondo de los pozos de una microplaca de poliestireno, juntamente con la adición de un anticuerpo monoclonal específico para un epítipo sobre una porción del polisacárido o del antígeno S-LPS. Posterior a la reacción, se mide la densidad óptica (DO), con ayuda de un espectrofotómetro, la cual servirá para calcular el porcentaje de inhibición (PI). El porcentaje de inhibición se calcula de acuerdo con la fórmula:

$$PI = \frac{\text{Promedio de } \left(\frac{DO \text{ de muestras}}{DO \text{ de controles}} \right) * 100}{\text{Promedio del control del conjugado}}$$

Se diagnostican como positivas aquellas muestras con un porcentaje de inhibición mayor del 30%, y negativas cuando el mismo sea menor del 30% (Sánchez et al., 2009).

8.1.7. Prueba de fluorescencia polarizada (FPA)

La FPA se fundamenta en el movimiento de rotación de las moléculas, mediante el uso de una sustancia fluorescente (fluorocromo) se marca una pequeña molécula donde la unión de esta a otra de igual o mayor tamaño puede ser medida a través de su velocidad de rotación y la capacidad de esta de polarizar o no la luz. En la FPA para el diagnóstico de brucelosis, se emplea generalmente una fracción del polisacárido-O (OPS) de 22 kD de una cepa en fase lisa de *B. abortus* como antígeno específico, este se marca con fluoresceína formando un conjugado. Al añadir el conjugado a una muestra que contiene anticuerpos específicos de *Brucella* (muestra positiva), se forma un inmunocomplejo de masa elevada. Este complejo es voluminoso y presenta una rotación lenta, por lo que despolariza la luz, sólo de modo parcial. Si no hay presentes anticuerpos específicos de *Brucella* (muestra negativa), el conjugado queda sin ligarse; este conjugado de menor tamaño presenta una rotación más rápida, lo que aumenta la despolarización (Nielsen & Yu, 2010).

8.1.8. Prueba de Inmuncaptura (BRUCELLACAPT®)

BRUCELLACAPT® es una prueba de inmuncaptura-aglutinación para la detección de anticuerpos totales frente a *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*. Permite detectar anticuerpos aglutinantes (IgA, IgG e IgM) y no aglutinantes (IgA e IgG) contra *Brucella*. La prueba consta de tiras de pocillos de fondo en U que contienen inmunoglobulinas antihumanas. Tras la adición de los sueros y su dilución, se añade el antígeno LPS de *B. abortus* y se incuban 24 horas hasta que se produce la aglutinación (Bosilkovski et al., 2010). Los sueros con títulos desde 40 y hasta 160

se consideraron reactivos a brucelosis, sin embargo, se recomienda aplicar técnicas de referencia como inmunoensayo ELISA para la confirmación de pacientes con diagnósticos positivos (Obregón et al., 2015). Estudios recientes han demostrado que esta prueba presenta una sensibilidad que oscilan entre el 74 y 100% y especificidad de entre el 59 % y 98 % y es útil para el diagnóstico de Brucelosis crónica (Casanova et al., 2009; Arabaci & Oldacay, 2012; Echeverría et al., 2019).

8.1.9. Prueba de inmunodifusión en gel de agarosa (IDGA)

La inmunodifusión en gel de agarosa (IDGA) es una prueba cualitativa, basada en los principios de doble difusión. Un anticuerpo y su antígeno homólogo soluble son colocados en fosos separados adaptados a un medio de difusión adecuado (agarosa), permitiendo su difusión hacia el medio. Entre ambos fosos se establece un gradiente de concentración de cada uno de los componentes de la reacción, es decir, entre el foso que contiene el LPS-R de *B. canis* como antígeno y el que contiene los anticuerpos de los sueros analizados (Carmichael et al., 1984). La placa se incuba a temperatura ambiente durante 24 a 72 horas hasta que se forme una precipitación que se dará donde la cantidad de anticuerpos y antígenos sea equivalente, manifestándose en forma de líneas blanquecinas (Guzmán & Bernal, 1999). Algunos estudios han demostrado que la prueba de IDAG presenta sensibilidad y especificidad mayor al 75% (López et al., 2005; Quevedo, 2007), usando como antígeno el hapteno nativo, presenta 96 % de sensibilidad y entre 80 a 100 % de especificidad, para el diagnóstico diferencial de infección con *B. abortus* o con la cepa vacunal S19 (González et al., 2006).

8.1.10. Prueba inmunocromatográfica

La prueba inmunocromatográfica se basa en la captura inmunológica de nanopartículas de oro recubiertas con anticuerpos anti-IgG durante su paso a través de una membrana de nitrocelulosa. Las inmunoglobulinas de isotipo IgG presentes en la muestra de suero reaccionan con las partículas de oro funcionalizadas con los anticuerpos anti-IgG y los complejos formados migran por cromatografía hacia la

zona de reacción. En esta zona se ha inmovilizado el antígeno (glicoproteína recombinante purificada) en la línea de ensayo y anticuerpos anti-IgG de en la línea control (Ciocchini et al., 2014).

Si una muestra de suero contiene anticuerpos IgG dirigidos contra el polisacárido O de *Brucella* (presente en especies lisas), los complejos nanopartícula-anticuerpo son capturados por el antígeno inmovilizado en la membrana, lo cual se visualiza como una banda de color rosa/rojo. Independientemente de la presencia en la muestra de anticuerpos IgG, los complejos que no fueron capturados en la línea de ensayo continúan migrando y son capturados en la línea de control por los anticuerpos anti-IgG dando origen también a la formación de una banda de color rosa/rojo. La aparición de la línea de control indica que la cromatografía se ha desarrollado correctamente y en condiciones que aseguran la reacción antígeno-anticuerpo. Por lo tanto, se considerará como resultado positivo cuando se observan dos bandas de color rosa/rojo (líneas de ensayo y de control) independientemente de la intensidad del color de estas; negativo cuando únicamente se observa una banda de color rosa/rojo correspondiente a la línea de control y un resultado invalido cuando no se observan bandas o cuando solo se observa una banda correspondiente a la línea de ensayo (Ciocchini et al., 2014).

8.2. Método directo para la detección de brucelosis (microbiológicos)

El aislamiento de *Brucella* spp. constituye el método diagnóstico definitivo. Suele obtenerse por hemocultivo o cultivo de médula ósea y, más raramente, por cultivo de líquido cefalorraquídeo o líquido articular (Peña y Gutiérrez, 1996). En los procesos agudos, incluso cuando la extracción de los hemocultivos se practica en fase afebril, el porcentaje de aislamiento oscila entre el 90-95% de los casos. En casos de fracaso terapéutico o reinfección este porcentaje no suele superar el 60% (Moreno, 2014).

8.2.1. Cultivo de *Brucella*

Existe una amplia variedad de medios de cultivo para este microorganismo, los más frecuentemente utilizados son caldo soya tripticasa (TSA), Columbia, infusión cerebro corazón, *Brucella*, tioglicolato y caldo de peptona suplementado y en ocasiones medios con resinas para neutralizar los antimicrobianos cuando el paciente está recibiendo tratamiento antibiótico previo. Estudios comparativos han demostrado que no existe un medio de cultivo que pueda considerarse superior a todos los demás (Loza et al., 2003), esto dependerá de diversos factores como el tipo de muestra, la sintomatología del paciente, entre otros. Para el cultivo de muestras sanguíneas se ha utilizado clásicamente el medio de cultivo de Castañeda o cualquier frasco de hemocultivo con medio bifásico. La ventaja es que permiten resembrar el medio líquido sobre la fase sólida sin necesidad de abrir o pinchar el frasco.

La fase sólida se compone de agar infusión cerebro corazón la cual se dispone en forma inclinada cubriendo la base del frasco y el ángulo necesario para poder adicionar la fase líquida a +/- dos centímetros por debajo, lo que facilita el manejo y buen crecimiento en ambas fases. La fase líquida se compone de caldo tripticasa de soja con extracto de levadura, electrolitos, cisteína, sacarosa y sulfato de magnesio. También contiene polianetol sulfonato de sodio (P.S.S.), el cual funge como anticoagulante, además de inhibir parcialmente la actividad de ciertos antibióticos y la fagocitosis de los leucocitos (Yagupsky, 1999).

Se requiere de sangre total que se puede extraer por punción venosa o arterial, el volumen que se recomienda es de 5 a 7 ml para adultos y de 2.5 a 4 ml para niños, sin embargo, existen reportes que indican mantener la relación 1 a 10 entre la muestra y el medio de cultivo (Reimer, 1997). El medio se incuba a 37 °C y la lectura se realiza diariamente para detectar signos visibles de crecimiento bacteriano, así como el enturbiamiento del medio, la hemólisis de los eritrocitos, la producción de gas o la formación de colonias en el fondo del frasco (Loza et al., 2003). En la mayoría de los procesos agudos, tras incubar el medio de 2 a 4 días, es posible observar en la fase sólida pequeñas colonias, una pequeña proporción de casos

presenta el crecimiento entre los 5 a 15 días, y sólo de forma excepcional, éste se retrasa hasta los 30 a 45 días (Peña y Gutiérrez, 1996). Las colonias se observan de un color amarillo pálido, pequeñas, convexas translúcidas no hemolíticas y agrupadas de forma arrosariada (Loza et al., 2003). Una vez observado el crecimiento se debe realizar una resiembra con ayuda de una jeringa, lo cual evita el abrir la botella. Se siembra por duplicado en placas de agar sangre al 5 -10%, en agar TSA con extracto de levaduras al 0.5% y en agar Mac Conkey. Una serie se incuba en atmósfera de CO₂ y la otra en atmósfera normal a 36° C. Al cabo de cuatro días, debe de observarse crecimiento visible en alguna de las series si existen bacterias viables de *Brucella*.

8.2.2. Identificación microscópica y colonial de *Brucella*

Como vimos anteriormente, la morfología microscópica de *Brucella* corresponde a bacilos cortos pequeños Gram negativos de 0.5 X 0.5 hasta 1.5 µm de longitud. Usando la tinción de Zielh-Neelsen modificada, *Brucella* se tiñen de color rojo.

En medio TSA, las cepas lisas (S) producen colonias circulares, convexas con bordes regulares, translúcidas y coloración ámbar. A la luz reflejada son brillantes, ligeramente opalescentes y de color gris azulado. En gelosa sangre no produce hemólisis y en agar Mac Conkey crecen poco y no fermentan la lactosa. Las cepas rugosas (R), en TSA, producen colonias semejantes en la forma, pero varían considerablemente en tamaño, color, consistencia y textura. En la figura 3 se puede observar estas diferencias entre los tipos de cepas.

En las cajas de TSA, se aconseja determinar la producción de catalasa y oxidasa, para las cuales en *Brucella* son positivas. Inmediatamente se procede a aglutinar a las colonias sospechosas con suero polivalente anti *Brucella*. Se recomienda realizar la suspensión de *Brucella* en solución salina fenolada al 1.0% extremando las precauciones. Si hay aglutinación, muy probablemente se trate de bacterias del género *Brucella* (López, 1989).



Figura 3. Ejemplificación de las colonias en fase R y S.

Nota. Colonias R y S de *Brucella*. Recuperado de: *Brucellosis: clinical and laboratory aspects* (p.161), por López et al., 1989, CRC Press Inc.

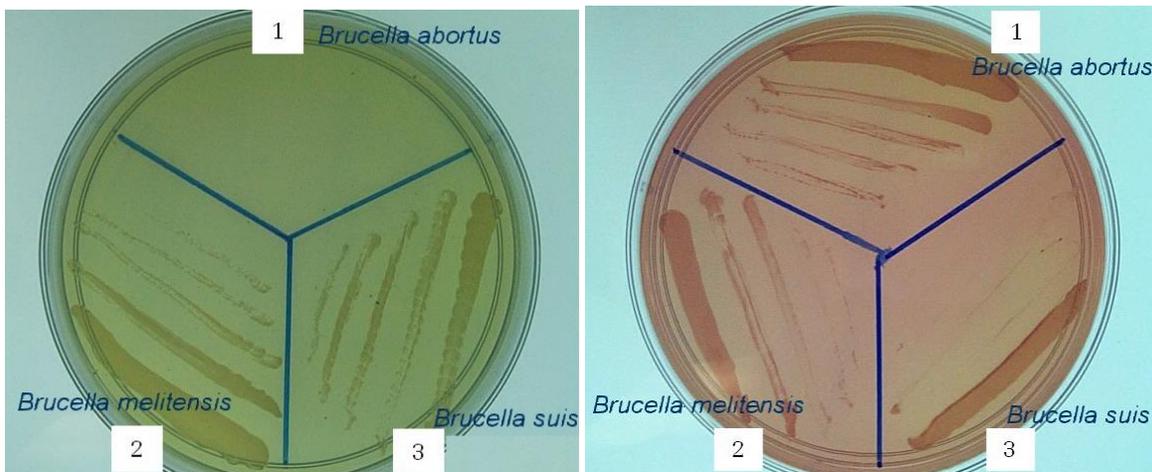
8.2.3. Identificación de la especie y el biovar de *Brucella*

Alton, G.G. et al. (1988) en su libro auspiciado por la FAO y la OMS recomiendan que, para identificar la especie y el biovar, se deberán efectuar pruebas bioquímicas especiales, las cuales se resumen a continuación:

- **Requerimientos de CO₂:** Inmediatamente después del primer aislamiento, la cepa en estudio se siembra por triplicado en tubos con agar soya tripticasa y extracto de levaduras inclinados. Se incuban dos tubos en atmósfera de CO₂ y el otro en atmósfera normal, a 36° C por 48 horas antes de que se desarrollen mutantes independientes de CO₂. Con el crecimiento de uno de los tubos, se prepara una suspensión de bacterias para inocular el resto de los medios de cultivo.
- **Medio de Kligler:** Se debe observar la ausencia de ácido y gas a partir de glucosa y lactosa.
- **Medio de urea de Christensen:** Se debe medir el tiempo en que vira el medio a rosa, debido a la producción de ureasa. *B. suis* produce la mayor cantidad de ureasa y en un tiempo muy corto comparada con las demás especies que producen menor cantidad.
- **Tubo inclinado con agar soya tripticasa:** Se debe colocar una tira de papel filtro impregnado con acetato de plomo de forma que sea sujetado por la

contratapa o el tapón de algodón para observar la aparición de H₂S, manifestado por el ennegrecimiento de la tira de papel filtro.

- **Citrato de Simmons:** En este medio no se debe modificar el color verde ya que *Brucella* no emplea este sustrato como fuente de carbono.
- **Medio de SIM:** Se debe observar la inmovilidad de las *Brucella* spp. y la ausencia de indol y H₂S en este medio.
- **Siembra en tiónina y fucsina:** Se compara el crecimiento en presencia de estos dos colorantes. En términos generales los cultivos de *B. melitensis* se desarrollan de forma muy similar en ambas placas de colorante a diferencia de *B. abortus* que se tiñe con fucsina y *B. suis* mayormente de tiónina.



Siembra de *Brucella* en placa con tiónina.

Siembra de *Brucella* en placa con fucsina.

- **Aglutinación con sueros monoespecíficos:** Se emplean el suero monovalente A y en monovalente M. El R se utiliza solo cuando se sospecha de *B. canis* o de otra especie rugosa natural. Al realizar esta prueba es muy importante tomar en consideración lo siguiente:
B. abortus puede contener antígeno A (biovar 1,2,3 y 6) o antígeno M (biovars 4,5 y 9) en forma de antígenos dominantes o ambos antígenos A y M (biotipo 7) en forma igualmente dominante.
B. suis puede tener antígeno A (biotipos 1,2 y 3) como antígeno dominante o ambos A y M (biotipo 4).

B. melitensis puede tener antígeno M (biotipo 1) o antígeno A (biotipo 2) como antígenos dominantes o ambos A y M (biotipo 3). Por consiguiente, cualquier cepa que aglutine con suero mono específico M, no es necesariamente *B. melitensis*.

Las consideraciones anteriores hacen que esta prueba deba ser efectuada e interpretada por personal con experiencia, dicha interpretación se resume en el anexo 1 de este documento.

8.3. Técnicas moleculares para la detección de *Brucella*

Las técnicas de biología molecular sirven para analizar ácidos nucleicos y para detectar, e identificar tanto microorganismos, como diferentes genotipos dentro de una misma especie y genes de resistencia al tratamiento farmacológico (Díaz, 2020). Todas estas técnicas generalmente requieren de un paso previo de extracción de DNA o RNA. Una vez extraído debe purificarse de forma adecuada para evitar la presencia en la muestra de inhibidores o sustancias que contaminen y que impidan la correcta realización de la técnica posterior. A continuación, se analizan las más estudiadas y que han sido o podrían aplicarse en la detección de *Brucella spp.* para el diagnóstico de brucelosis.

8.3.1. Prueba molecular (PCR) para la detección de *Brucella spp.*

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de DNA durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima DNA polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el DNA en las células. Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (DNA o DNAC), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg +), una solución amortiguadora o buffer y H₂O libre de nucleasas. Todos estos elementos

interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión llevadas a cabo en un termociclador. Por último, los productos de la PCR (también llamados amplicones) son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa (Tamay de Dios et al., 2013).

El desarrollo de pruebas PCR constituye una importante alternativa para el diagnóstico de muchas enfermedades provocadas por bacterias de crecimiento lento como *Brucella*. Mediante esta prueba se puede amplificar DNA del género *Brucella* presente en sangre periférica u otras muestras clínicas. Para ello, se utilizan dos iniciadores de 21 nucleótidos respectivamente denominados B4 (5'-TGGCTCGGTTGCCAATATCAA-3') y B5 (5'-CGCGCTTGCCTTTCAGGTCTG-3'). Estos oligonucleótidos amplifican una señal de 223 pares de bases del gen que codifica la síntesis de una proteína de membrana de la superficie externa de *B. abortus* de 31 kDa (BCSP31) específica del género *Brucella*. La mezcla se amplifica en un termociclador y posteriormente, los fragmentos amplificados, se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa y el resultado se visualiza en un transiluminador UV (Álvarez et al., 2015).

8.3.2. PCR en tiempo real

El principio de esta técnica se basa en la PCR convencional o de punto final, sólo que la forma en cómo se detectan y analizan los productos de la amplificación es diferente. El término en tiempo real se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción. Por otra parte, mediante esta prueba es posible cuantificar la cantidad de DNA en la muestra, a diferencia de la PCR punto final en donde no es posible detectar en tiempo real ni cuantificar la secuencia. Estas dos características representan grandes ventajas de la PCR en tiempo real, ya que el producto de amplificación es monitoreado conforme transcurre la reacción sin que haya la necesidad de que sea manipulado en un gel de agarosa para conocer si la reacción fue exitosa (Tamay de Dios et al., 2013).

Existen diversas pruebas de PCR que han sido diseñadas para la detección de *Brucella* spp. en muestras clínicas (Romero et al., 1995; Leal et al., 1995; Bricker et al., 2002). Sin embargo, la estandarización de estas metodologías constituye una etapa importante para su aplicación en el diagnóstico de la brucelosis. Además, hay que tener en cuenta que esta prueba no reemplaza las pruebas serológicas por el elevado costo que implica su utilización y la falta de personal calificado para su realización (Bricker et al., 2002).

8.3.3. Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)

El método LAMP está basado en el principio de síntesis de DNA por desplazamiento de cadena, el cual es llevado a cabo por una polimerasa con alta actividad de desplazamiento de cadena y un sistema de dos cebadores internos y dos cebadores externos para reconocer un total de seis secuencias distintas en el DNA blanco (Notomi et al., 2000). Los procedimientos estándares de LAMP son básicamente tres:

1. Extracción del DNA presente en la muestra.
2. Amplificación del ácido nucleico.
3. Detección del ácido nucleico presente por inspección visual mediante métodos colorimétricos, turbidimétricos o con fluorescencia.

En algunos estudios se han diseñado cebadores LAMP para la detección de *Brucella* spp. enfocándose en el gen omp25 y en el gen bcsp31 específicos de *Brucella* (Chen et al., 2013; Moeini et al., 2020). La amplificación de DNA se realiza con Bst DNA polimerasa a una temperatura de 65 °C en 60 min, obteniendo más de 100 fg de DNA de *Brucella*, los cuales son evidenciados mediante tinción de SYBR Green I y electroforesis en gel de agarosa al 2,0%. El método LAMP es factible para la detección de *Brucella* spp. a partir de muestras de sangre y ha demostrado tener una sensibilidad hasta 10 veces mayor comparada con la PCR convencional (Chen et al., 2013; Moeini et al., 2020).

8.3.4. MALDI-TOF

La ionización MALDI (desorción/ionización mediante láser asistida por Matriz), acoplada a un analizador TOF (tiempo de vuelo), es una técnica de ionización suave

utilizada en espectrometría de masas que permite el análisis de biomoléculas. Un espectrómetro de masas se compone de tres unidades funcionales, una fuente ionizante para transferir iones a moléculas de la muestra en una fase gaseosa, un analizador de masas que separa los iones de acuerdo con su relación masa/carga y un dispositivo de detección para monitorizar los iones separados (Croxatto et al., 2012).

Una pequeña porción de una colonia de bacterias crecida en medio de cultivo sólido se deposita directamente sobre una placa metálica conductora; un pequeño número de células entre, 10^4 a 10^5 unidades formadoras de colonias son necesarias para el análisis (Nomura, 2015). Posteriormente, a la placa con el microorganismo se adiciona una solución saturada de un compuesto orgánico de baja masa, denominada matriz. Tras el secado, la muestra del microorganismo y la matriz se cristalizan y forman un depósito sólido de muestra incrustado en la matriz, la cual es esencial para la ionización exitosa de la muestra pues actúa como un “andamio” en el cual puede ocurrir la ionización y como un proveedor de protones para la ionización (Clark et al., 2013).

Después de la cristalización de la matriz y del compuesto, la placa metálica se introduce en el espectrómetro de masas, en donde la mezcla es irradiada con pulsos cortos de un rayo láser UV (por lo general, un haz de láser con longitud de onda de 337 nm). La interacción entre los fotones de las moléculas de láser y de la matriz, causados por la absorción de la energía del haz, desencadena una sublimación de la matriz en una fase gaseosa, seguida por la ionización de la muestra del microorganismo con mínima fragmentación (por ello se denomina “ionización suave”). Al ionizarse, las proteínas son aceleradas a través de un campo electrostático y luego son expulsadas en un tubo de vuelo al vacío donde se separan en función de su velocidad o tiempo de vuelo, llegando finalmente al detector de masas que genera información característica de la composición del microorganismo mediante un espectro de picos, frente a su relación masa/carga (m/z), llamada también huella digital de la masa de los péptidos (Clark et al., 2013). Una vez generado el perfil espectral del microorganismo, es comparado automáticamente

mediante un programa informático con una base de datos de espectros que es construida a partir de cepas de referencia, permitiendo su identificación (Murray, 2012).

La identificación de los microorganismos por MALDI-TOF se basa en que las huellas digitales espectrales varían entre los microorganismos, algunos picos son específicos del género, otros de la especie y otros, a veces, de las subespecies (Carbonnelle et al., 2011).

Aunque al momento de esta investigación aún no se ha utilizado esta técnica para la identificación de *Brucella* spp., se han reportado una variedad de protocolos diseñados para identificar directamente y con precisión los microorganismos presentes en hemocultivos positivos con diferentes procedimientos de preparación de la muestra, obteniendo niveles de sensibilidad y especificidad superiores al 90% (Bazzi et al., 2016).

8.3.5. Aptámeros (SELEX)

Los Aptámeros se definen como una secuencia sencilla de oligonucleótidos de DNA o RNA, de corta longitud que reconocen una amplia gama de moléculas diana, tales como proteínas, carbohidratos, moléculas pequeñas, células enteras e incluso microorganismos, debido a su sencilla y corta estructura, ya que puede plegarse tridimensionalmente con facilidad de tal forma que su unión a la molécula diana es muy selectiva y estable (Spiridonova, 2010).

Los aptámeros se obtienen por un método conocido como método SELEX (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment) o (Evolución Sistemática de ligandos por Enriquecimiento Exponencial), que se desarrolla a partir de la repetición sucesiva de 5 etapas: incubación, separación, elución, amplificación y acondicionamiento. Este proceso se realiza a partir de una biblioteca de oligonucleótidos, fragmentos de DNA (10^{15} moléculas) que tiene secuencias conocidas fijas en los extremos 5' y 3' (cebadores) que servirán para su posterior amplificación por PCR y una región central de secuencias al azar de entre 40 y 60 nucleótidos. Estas secuencias se sintetizan químicamente mediante métodos en

fase sólida añadiendo una mezcla de los cuatro nucleótidos trifosfato de forma aleatoria (Hernández y Botero, 2012).

Inicialmente se incuba la colección de oligonucleótidos con la molécula diana durante un cierto tiempo para que las secuencias tengan afinidad por enlazarse a ella (Incubación). A continuación, se separan las secuencias que se han unido a la molécula diana de las secuencias que no lo hicieron, descartando estas últimas (separación). Las secuencias que se han enlazado son separadas de las dianas por elución y se amplifican mediante PCR (elución y amplificación). Por último, se realiza una etapa de acondicionamiento en la que las hebras dobles resultantes de la PCR se separan para obtener hebras de cadena sencilla (acondicionamiento).

Esta técnica molecular ya ha sido aplicada a en algunos estudios en los que se ha logrado desarrollar aptámeros para la detección de *B. abortus* y *B. melitensis* con una notable eficiencia de unión y una constante de disociación (K_d) en un rango picoMolar (Nosaz et al., 2020), los cuales son buenos candidatos en el desarrollo de pruebas de ensayo rápido para el diagnóstico de brucelosis.

8.3.6. Secuenciación de nueva generación (NGS)

La secuenciación de nueva generación (NGS) es una técnica molecular que podría ser de gran utilidad para la detección y diferenciación de especies infectivas de *Brucella* spp., dicha técnica consiste en establecer el orden de los nucleótidos presentes en las moléculas de DNA o RNA estudiadas. Dichos ácidos nucleicos previamente extraídos se fragmentan y estos son amplificados en una superficie sólida, donde se agrupan para secuenciarse. La secuenciación se realiza en múltiples ciclos, en los cuales se van añadiendo nucleótidos marcados con fluorescencia, que serán fotografiados y traducidos en la secuencia o el orden que corresponde (Diaz, 2020).

Hay diferentes plataformas de secuenciación masiva (454 Roche, SOLiD, Illumina, Ion Torrent, Pacific Bioscience, Oxford Nanopore) que varían entre sí dependiendo del método de preparación de las plantillas para la secuenciación, la reacción de secuenciación y la detección. Cada una de estas plataformas puede tener diferentes

equipos, diferentes niveles de rendimiento, diferentes números de lecturas y, por lo tanto, el coste económico es diferente para cada una (Garrido et al., 2017; Goodwin et al., 2016).

9. Tratamientos y reincidencia de la enfermedad

La característica de desarrollo intracelular de *Brucella* ocasiona que el tratamiento de la enfermedad constituya un reto, desde hace varios años se ha demostrado que la monoterapia como tratamiento de la brucelosis es inefectiva y que es necesaria la asociación de dos o más fármacos durante un periodo considerable, así mismo se debe incluir por lo menos un antibiótico con buena penetración a nivel intracelular (Skalsky et al., 2008). Según la Organización mundial de la Salud (OMS, 2020), una de las opciones terapéuticas recomendadas contra la brucelosis causada por *Brucella* (*B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis* o *B. canis*) es administrar, en niños mayores de 8 años y adultos, 100 mg de doxiciclina dos veces al día durante 45 días, más 1 g de estreptomina al día durante 15 días. Si no se observa una adecuada respuesta del paciente, la principal terapia alternativa es administrar 100 mg de doxiciclina dos veces al día durante 45 días, más 15 mg de rifampicina por kilo y día (600-900 mg) durante 45 días. Algunos autores (Carrillo y Gutazzo, 1997) sugieren que la estreptomina puede sustituirse por 5 mg de gentamicina por kilo y día durante 5 a 10 días, pero no se dispone actualmente de ningún estudio que compare directamente los dos esquemas.

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) en su libro “Tratamiento de las enfermedades infecciosas 2020-2022” recomienda que, para niños menores de 8 años, las opciones incluyen administrar 5 mg/kg de trimetoprima con sulfametoxazol cada 12 h por 6 semanas más 2 mg/kg gentamicina o cada 8 h por 1 semana. También recomienda continuar el tratamiento por 3 meses en casos de neuro brucelosis o endocarditis.

El tratamiento de la brucelosis en el embarazo es de gran importancia, ya que en algunos estudios se demuestra que el manejo inmediato de esta enfermedad se acompaña de una disminución importante en el número de abortos, sin embargo,

debido a que todos los fármacos que existen para el tratamiento de la brucelosis cruzan la barrera placentaria, ha sido una limitante para establecer el tratamiento de elección (Elshamy & Ahmed, 2008). Existen estudios que demuestran que la administración de rifampicina sola o en combinación con trimetoprima-sulfametoxazol es efectiva y segura tanto para la madre como para el producto (Ozbay & Inanmis, 2006; Khan et al., 2001). Por lo que el esquema terapéutico recomendado durante el embarazo es la administración de rifampicina a dosis de 600 mg al día durante 6 semanas (Vega et al., 2008).

Un porcentaje variable de enfermos sufren de episodios de reincidencia de la enfermedad causada por *Brucella*, los cuales se pueden manifestar a pesar de recibir el tratamiento adecuado y generalmente se van a presentar en los primeros seis meses posteriores a la suspensión del antibiótico y en estos casos se recomienda administrar el esquema de Rifampicina cápsulas de 300 mg o suspensión con 100 mg cada 8 a 12 horas por 6 semanas más doxiciclina en cápsulas de 100 mg cada 12 horas por 6 semanas (Rodríguez et al., 2014; Segura, 2005).

10. Discusión

En México la mayoría de los pacientes son diagnosticados con brucelosis a través de métodos indirectos, principalmente se utiliza la aglutinación con Rosa de Bengala la cual es una prueba presuntiva muy económica, con una aproximación diagnóstica en pocos minutos y con una sensibilidad entre el 95 al 99%, (Méndez et al. 2013). Es de gran utilidad en áreas rurales, en donde no es posible llevar a cabo la aglutinación en tubo y en casos en donde es muy importante un tratamiento temprano como en la neuro brucelosis, la artritis y la orquitis (Pappas et al., 2006; Tawfiq, 2008), Sin embargo, debido a su baja especificidad, un resultado positivo a través de esta prueba debe ser corroborada por medio de una prueba confirmatoria ya que este puede indicar varios escenarios, desde una infección activa, anticuerpos que persisten después de la recuperación, contacto accidental con el germen, no necesariamente seguido de la enfermedad o exposición a un microorganismo que

presenta reacción cruzada con *Brucella* spp. como *Yersinia enterocolitica* serotipo 09, *Proteus* cepa Ox-19, *Francisella tularensis* y *Vibrio cholerae*, incluyendo vacuna contra cólera, dando como consecuencia falsos positivos (Rentarías et al., 2005; Roger et al., 2005).

Como pruebas confirmatorias se utilizan las pruebas de 2-ME y SAT para determinen el título y tipo de anticuerpos presentes (Secretaría de Salud, 2012). Además de tener gran especificidad para demostrar que ha existido contacto con *Brucella* spp., la negatividad de dichas pruebas permite prácticamente descartar la enfermedad. Por otro lado, algunos pacientes con brucelosis presentan recaídas que se relacionan con un tratamiento inapropiado, virulencia de la cepa o respuesta inmunológica deficiente. En otros se observa que varios meses después del tratamiento persisten bajos niveles de anticuerpos, aun cuando presentaron una evolución clínica satisfactoria (Alsubaje et al., 2005; Guzmán et al., 2016). Todo esto dificulta la interpretación del título y tipo de anticuerpos presentes, ya que no se conoce con certeza el tiempo de la eliminación de *Brucella* y tampoco existe un criterio seguro de cura de la enfermedad, por lo que estas pruebas no son útiles en períodos iniciales de la enfermedad o en casos de brucelosis crónica.

Los anticuerpos detectados por aglutinación son anticuerpos divalentes que en casos de infección crónica suelen ser muy bajos (Castro, et al., 2005), en estos casos se recomienda realizar la prueba de Coombs o Brucellcapt®, las cuales detecta anticuerpos IgG incompletos o no aglutinables (Sbriglio & Sainz, 2007). Ambas pruebas en estudios comparativos han demostrado contar con una alta sensibilidad y especificidad, llegando a ser del 100% y 80% para prueba de Coombs y del 95% y 74% para Brucellcapt® (Serra, et al., 2001). Usando esta última, cuando se obtienen sueros con títulos desde 40 y hasta 160 se consideraron reactivos a brucelosis (Obregón et al., 2015), pero debe evaluarse juntamente con las demás pruebas clínicas y la seroprevalencia de la enfermedad en la zona antes de emitir un diagnóstico. Ambas pruebas se recomiendan en áreas endémicas para la detección de casos crónicos, ya que es lo suficientemente sensible para un diagnóstico adecuado de las formas focalizadas de la brucelosis.

La prueba de ELISA permite detectar y cuantificar los anticuerpos IgG, IgM e IgA (completos e incompletos) contra el lipopolisacárido de la bacteria, lo que la vuelve un método diagnóstico más sensible y específico que las demás pruebas serológicas, por lo que se recomienda en áreas endémicas y en individuos con recidivas de la enfermedad (Vega et al., 2008). Estudios han demostrado que la prueba de ELISA-i posee una sensibilidad relativa del 96,2 % y del 76 % en pacientes con brucelosis aguda y crónica, respectivamente, y una especificidad del 100% (Ellie, 2018). En el caso de ELISA-c se ha desarrollado y utilizado con bastante éxito para el diagnóstico de brucelosis causada por *B. abortus*, debido a su alta sensibilidad muy cercana al 100% y especificidad del 99,6%, además de poseer una alta especificidad para diferenciar anticuerpos vacunales con un valor de 99,4% (D'Pool et al., 2004). Sin embargo, pueden existir falsos positivos para IgM en presencia de factor reumatoide y falsos negativos en situaciones de exceso de anticuerpos de tipo IgG que limitan su utilización (Rodríguez y Solera, 2014).

La técnica de FPA tiene las ventajas de realizarse en pocos minutos, poder ser ejecutada fuera del laboratorio de diagnóstico utilizando un analizador portátil y de poseer una sensibilidad entre 98,1 y 99,02% y una especificidad entre 99,8 y 100%, detectando incluso anticuerpos asimétricos no aglutinantes comunes en los pacientes crónicos lo que reduce la reacción cruzada con otras bacterias Gram negativas (Nielsen & Yu, 2010). Sin embargo, algunos autores recomiendan seguir usando C-ELISA como una prueba de confirmación, hasta que la FPA sea adecuadamente estandarizada para el diagnóstico de brucelosis humana (Quintero et al., 2014).

Las pruebas de inmunocromatográfica para detección de *brucella* spp. han demostrado tener una sensibilidad y especificidad relativa de un 98.5% y 99.47% comparadas con la prueba de RB, sin embargo, puede presentar reacciones cruzadas con otros LPS de estructura similar a los de *Brucella* spp. (Diaz et al., 2015). Por otro lado, posee las ventaja de no requerir de conocimientos técnicos muy específicos, equipamiento especializado, electricidad, refrigeración y ser fáciles

de realizar e interpretar, lo que hace a estas pruebas ideales para su uso en poblaciones humanas ubicadas en condiciones de difícil acceso.

El cultivo y aislamiento de *Brucella* spp. nos otorga el diagnóstico definitivo y la identificación de la especie y biovar (Álvarez, Díaz & Ortiz, 2015). Pero a pesar de su alta especificidad, la sensibilidad de la detección varía de 15% a 70% en los pacientes con infección aguda y es incluso menor en los pacientes con infección crónica (Seleem et al., 2010). Por otro lado, se ha visto que los hemocultivos no siempre resultan positivos cuando la serología es positiva y que el aislamiento no siempre es posible, estos pueden ser negativos cuando no hubo una fase aguda aparente, cuando la cantidad de *Brucella* en las muestras clínicas es demasiado baja o con el uso de antibióticos antes del diagnóstico (Navarro et al., 2004; Álvarez et al., 2015).

El desarrollo de pruebas moleculares constituye una importante alternativa para el diagnóstico de muchas enfermedades provocadas por bacterias de crecimiento lento como *Brucella* spp., sin embargo, la estandarización de estas metodologías constituye una etapa importante para su aplicación como pruebas diagnósticas. Las principales limitaciones son el requerir de personal calificado, así como el uso de equipos y reactivos de alto costo y no siempre disponibles en todas las regiones, sobre todo en los países en vía de desarrollo donde *Brucella* se halla con mayor frecuencia o en regiones donde es endémica.

De todas las pruebas moleculares presentadas la PCR es la prueba molecular más estudiada y aplicada para para la detección de *Brucella* spp. en muestras clínicas (Romero et al., 1995; Bricker, 2002; Navarro et al., 2004; Álvarez et al., 2015; Moeni et al., 2020). Esta prueba molecular detecta específicamente al género *Brucella* y serían de gran utilidad en el diagnóstico, sobre todo en pacientes donde se sospeche de reacciones cruzadas (Padilla et al., 2003; Navarro et al., 2004). En los últimos años, se han observado resultados muy satisfactorios con la utilización de la PCR en sangre periférica de pacientes con brucelosis, para el diagnóstico de la fase inicial de la enfermedad y para la identificación de las recaídas. Estudios comparativos han lograron demostrar que la PCR puede alcanzar una sensibilidad

del 100% y especificidad del 80.23% comparada con el hemocultivo (Álvarez et al., 2015). En otro estudio en el que se evaluó la prueba de PCR para la detección de *B. canis* en humanos obtuvo una sensibilidad del 92,6% y una especificidad del 90% en comparación con el hemocultivo (Sánchez et al., 2019). El método LAMP es factible para la detección de *Brucella* spp. a partir de muestras de sangre y ha demostrado tener una sensibilidad hasta 10 veces mayor comparada con la PCR convencional (Chen et al., 2013; Moeini et al., 2020), sin embargo, esta prueba, aunada a las pruebas MALDI-TOF, Aptameros y la secuenciación de nueva generación presentadas en este documento, continúan siendo técnicas nuevas utilizada para la detección de *Brucella* spp., por lo que será necesario que otros grupos corroboren su eficacia y se defina con precisión la metodología más apropiada para su utilización.

Mientras tanto, la PCR puede ser de mucha utilidad para el seguimiento evolutivo de los pacientes que presentan un curso clínico complicado, sobre todo en muestras clínicas, cuyos cultivos son, con frecuencia, negativos en los medios habituales y en aquellos laboratorios que dispongan de la infraestructura necesaria para su realización.

La elección de la prueba diagnóstica a utilizar dependerá de la etapa y antecedentes clínicos del paciente, así como del equipo con el que se cuente en el hospital o centro de salud donde se esté tratando. Es importante la participación del sector de salud pública en la divulgación a la población sobre cómo evitar el contagio de *Brucella* spp. así como de la sintomatología más común que se presenta una vez infectado el paciente. Esto podría disminuir el tiempo en el que acudan a los centros de salud, lo que podría mejorar el diagnóstico y la elección de un tratamiento por parte del personal médico. Se recomienda realizar una revisión bibliográfica que incluya los equipos automatizados con metodologías validadas, que han surgido a partir de las nuevas tecnologías para el diagnóstico de brucelosis, ya que por falta de tiempo, recursos y capacitación en el manejo de dichas tecnologías no se ha logrado incluirlos.

11. Bibliografía

1. Abel, C.H., González, R.S., Prat M.I. (2005) Brucelosis: una revisión práctica. *Acta Bioquím Clín Latinoam*; 39 (2): 203-16.
2. Alsubaje, S., Almuneef, M., Alshaalan, M., Balkhy, H., Albanyan, E., Atola, S. (2005). Acute brucellosis in Saudi families: relationship between serology and clinical symptoms. *Int J Infect Dis*; 9 (4): 218-24.
3. Alton, G.G., Jones, L.M., Pietz, D.E., Verger, J.M. (1988). *Techniques for the brucellosis laboratory*. 2^{da} Ed. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris.
4. Álvarez, H.N., Díaz, F.M. Ortiz, R. (2015). Brucelosis, una zoonosis frecuente. *Medicina e Investigación*; 3(2): 129-133.
5. Álvarez, O.M., Saldaña, F.C., Ballesteros, E.M., Martínez, V.I., López, M.A. Briones, L.E. Morales, L.A. (2015). Comparación de las pruebas: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), serología y hemocultivo con respecto a sensibilidad y especificidad, para la detección de *Brucella* spp. en muestras humanas. *Gac Med Mex.*;151:620-7.
6. Agasthya, A., Isloor, S., Prabhudas, K. (2007). Brucellosis in high-risk group individuals. *Indian J Med Microbiol*; 25: 28-31.
7. Anastasio, R.D., Staniscia, T., Milia, M.L., Manzoli, L., Capasso, L. (2011). Origin, evolution and paleoepidemiology of brucellosis. *Epidemiol Infect*; 139:149-156.
8. Angarita, M., Torres, M., Díaz, A. (2017). Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura. *Rev. Habanera Ciencias Médicas*; 16(5): 796–807
9. Arabaci, F. & Oldacay, M. (2012) Evaluation of serological test for human brucellosis in an endemic area. *J Microb Infect Dis.*;2(2):50-6.
10. Arnow, P.M., Smaron, M., Ormiste, V. (1984). Brucellosis in a group of travelers to Spain. *JAMA*; 251 (4): 505-7.
11. Atluri, V.L., Xavier, M.N., de Jong, M.F., den Hartigh, A.B., Tsolis, R.M. (2011). Interactions of the human pathogenic *Brucella* species with their hosts. *Annu Rev Microbiol*; 65: 523-41.

12. Baldi, P.C., Wanke, M.M., Loza, M.E., Fossati, C.A. (1994). *Brucella abortus* cytoplasmic proteins used as antigens in an ELISA potentially useful for the diagnosis of canine brucellosis. *Vet Microbiol*; 41(1-2): 127-34.
13. Bayle, G.G., Krahn, J.B., Drasar, B.S., Stoker, N.G. (1992). Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J Trop Med Hyg*; 95(4):271-5.
14. Baron, E.J., Miller, J.M. (2008). Bacterial and fungal infections among diagnostic laboratory workers: evaluating the risk. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 60: 241-6.
15. Bazzi, A.M., Rabaan, A.A., Edaily, Z., John, S., Fawarah, M.M., Tawfiq, J.A. (2016). Comparison among four proposed direct blood culture microbial identification methods using MALDI-TOF MS. *J Infect Public Health.*; 34(16) 68-5.
16. Bosilkovski, M., Katerina, S., Zaklina, S., Ivan V. The role of Brucellacapt test for follow-up patients with brucellosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2010 Sep;33(5):435-42.
17. Bricker, B.J. (2002). PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Vet Microbiol*; 90 (1-4): 435-446.
18. Carbonnelle, E., Mesquita, C., Bille, E., Day, N., Dauphin, B., Beretti, J.L. (2011). MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory *Clin Biochem.*; 44(1):104-9.
19. Carmichael, L.E., Zoha, S.J., Flores, C.R. (1984). Problemas en el serodiagnóstico de la brucelosis canina: respuestas del perro a la pared celular y antígenos internos de *Brucella canis*. *Avances en estandarización biológica*; 56: 371-383.
20. Carrillo, P.C., Gotuzzo, E. (1997). Brucellosis. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 14(1), 63-66.
21. Casanova, A., Ariza, J., Rubio, M., Masuet, C., Díaz, R. (2009). Brucellacapt versus classical test in the serological diagnosis and management of human brucellosis. *Clinical and Vaccine Immunology.*;16(6):844-51.
22. Castro, H.A., González, S.R., Prat, M.I. (2005). Brucellosis: una revisión práctica. *Acta Bioquím Clín Latinoam.*;39:203-16.

23. Chen S, Li X, Li J, Atwill ER. (2013). Rapid detection of *Brucella* spp. using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Methods Mol Biol.*; 1039:99-108.
24. Ciocchini, A.E., Rey S.D., Melli, L.J., Guidolin, L.S., Iwashkiw, J., Elena, S., Franco, C., Nicola, A.M., Feldman, M.F., Comerci, D.J. & Ugalde, J.E. (2014) A bacterial engineered glycoprotein as a novel antigen for diagnosis of bovine brucellosis. *Veterinary Microbiology*.7; 172(3-4):455-65.
25. Clark, A.E., Kaleta, E.J., Arora, A., Wolk, D.M. (2013). Matrix-Assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Rev. Clin Microbiol*;*26(3):547–603.*
26. Croxatto, A., Prod'hom, G., Greub, G. (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *Rev. Microbiol. FEMS*; 36 (2): 380–407.
27. D'Pool, G., Rivera P.S., Torres, T., Pérez, M., García, A., Castejón, O. & Rojas, N. (2004). Prevalencia de brucelosis bovina mediante ELISA competitivo en el municipio la Cañada de Urdaneta, estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica*, 14(2), 168-176.
28. Díaz E., Hernández L., Valero G., Arellano B. 2002. Diagnóstico de *Brucelosis* Animal, 2ª, edición, pp. 1-7.
29. Díaz, H.D., Cruz S.Y., Cruz S.O., Martín A.D., Alfonso, G.M., Ortiz, L.E., Fragas, Q.A., Montano, T.L., & Silva, C.E. (2015). Desarrollo y evaluación del desempeño de una prueba rápida inmunocromatográfica para el diagnóstico de la brucelosis. *Revista de Salud Animal*, 37(2), 105-111.
30. Díaz M.O. (2020). Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *Rev. Dig. Npunto*; 3 (30): 88-111.
31. Dorneles, E.M., Teixeira, C.A., Araújo, M.S., Sriranganathan, N., Lage, A.P. (2015). Immune response triggered by *Brucella abortus* following infection or vaccination. *Vaccine*; 17 (31): 3659-66.
32. Echevarría, P.E., Obregón, F.A., Rodríguez O.Y., Lugo S.O. (2019). Evaluation of the system Brucellacapt® for serological diagnosis of human brucellosis in Cuba. *Rev cubana Med Trop.*;71(1):1-11.

33. Ellie LLC. (2018). *Brucella* iELISA OPS A. WI 53022, U.S.A.: Package Insert 0419.
34. Elshamy, M., Ahmed, A. (2008). The effects of maternal brucellosis on pregnancy outcome. *J Infect Developing Countries*; 2(3): 230-34.
35. Foster, G., Osterman, B.S., Godfroid, J., Jacques, I., Cloeckaert, A. (2007). *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int J Syst Evol Microbiol*; 57 (11): 2688-93.
36. Freer, E., Moreno, E., Moriyón, I., Pizarro, C.J., Weintraub, A., Gorvel J.P. (1996) *Brucella-Salmonella* lipopolysaccharide chimeras are less permeable to hydrophobic probes and more sensitive to cationic peptides and EDTA than their native *Brucella* sp. counterparts. *J Bacteriol.*;178: 5867-5876.
37. Garrido, J.A., García, M.F., Alvarez, J.A, Manzano, A.F. (2017) DNA sequencing sensors: An overview. *Sensors (Switzerland)*; 7(3): 1–15.
38. Godfroid, J., Cloeckaert, A., Liautard, J.P., Kohler, S., Fretin, D., Walravens K. (2005). From the discovery of the Malta Fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. *Vet Res*; 36 (3): 313-26.
39. Godfroid, J., DeBolle, X., Roop, R.M., O'Callaghan, D., Tsolis, R.M. (2014). The quest for a true one health perspective of brucellosis. *Rev Sci Tech*; 33 (2): 521-38.
40. Godfroid, J., Scholz, H.C., Barbier, T., Nicolas, C., Wattiau, P., Fretin, D. (2011). Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century. *Prev Med Vet*; 102:118-131.
41. Goldbaum, F.A., Velikosky, C.A., Baldi, P.C., Mörtl, S., Bacher, A., Fossati, C.A. (1999). The 18 kDa cytoplasmic protein of *Brucella* spp., an antigen useful for diagnosis, is a lumazine synthase. *J Med Microbiol*; 48: 833-9.
42. González M.E., Hernandez, A.L., Diaz, A.E. (2006). Radial immunodiffusion test with native hapten in the differentiation of cattle with repeated *Brucella abortus* S19 strain revaccinations. *Téc Pecu Méx*; 44(2): 269-276.
43. Goodwin, S., McPherson, J.D., McCombie, W.R. (2016). Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet.*; 17(6): 333-51.

44. Guzmán, H., Rosa, L., Contreras, R., Araceli, Á., Calderón, E. D., & Morales, M. R. (2016). Brucellosis: a zoonosis of importance in Mexico. *Revista chilena de infectología*, 33(6), 656-662.
45. Hernández R. (2002) Brucelosis. *Rev Med UV.*;2:35-38.
46. Hernández, F.J., Botero, J.A. (2012). Aptámeros: agentes diagnósticos y terapéuticos. *Iatreia*. 2; 159-168.
47. Herrera, B., & Cárdenas, C. (2003). Brucelosis: Diagnostico serológico y vacunas. Lima, Perú: Instituto nacional de salud. Centro nacional de productos biológicos. pp. 20-44.
48. Jia, P. & Joyner, A. (2015). Human brucellosis occurrences in inner Mongolia, China: a spatio-temporal distribution and ecological niche modeling approach. *BMC Infect Dis*; 15: 36.
49. Khan, M.Y., Mah, M.W., Memish, Z.A. (2001). Brucellosis in a pregnant woman. *Clin Infect Dis*; 32(8): 1172-77
50. Kumar, A. (2010) Brucellosis: need of public health intervention in rural India. *Prilozi*; 31 (1): 219-31.
51. Leal, D.S., López, M.A., Martínez, Soriano, J.P. (1995) Molecular detection of *Brucella* spp.: rapid identification of *B. abortus* biovar I am using PCR. *Arch Med Res*; 26(3):263-7.
52. Lo, R., Turner, M.S., Weeks, M., Bansal N. (2016). Culture-independent bacterial community profiling of carbon dioxide treated raw milk, *International Journal of Food Microbiology*; 233:81-89.
53. López, A. Contreras, A. (2004). *Brucella*. *Scand J Infect Dis*; 36:636-8.
54. López, G., Ayala, S.M., Escobar, G.I., Lucero, N.E. (2005). Use of *Brucella canis* antigen for detection of ovine serum antibodies against *Brucella ovis*. *Vet. Microbiol.* 105(3-4): 181-187.
55. López M.A. (1989) Brucellosis; clinical and laboratory aspects. Boca Raton FL, USA: CRC Press, Inc;151-161.
56. Loza, E., Alomar, P., Bernal, A., Pérez, J.L., Picazo, J.J., Sarazá, M.L. (2003). Procedimientos en Microbiología Clínica, Seguridad en el Laboratorio de Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Madrid.

57. Madkour, M., Kasper, D. (2001). Brucellosis. Principios de Medicina Interna. 15th ed. México DC: McGraw Hill Interamericana-División Médica. p. 1166-9.
58. Mancini, F.R., Bella, A., Graziani, C., Marianelli, C., Mughini-Gras, L., Pasquali, P. (2014). Trends of human brucellosis in Italy, 1998-2010. *Epidemiol Infect*; 142 (6): 1188-95.
59. Mantur, B.G., Mulimani, M.S., Bidari, L.H. (2016). Zoonosis. *Rev Chilena Infectol*; 33 (6): 656-662.
60. Martirosyan, A., Moreno, E., Gorvel, J.P. (2011). An evolutionary strategy for a stealthy intracellular *Brucella* pathogen. *Immunol Rev*; 240 (1): 211-34.
61. Michaux, C.S., Bourg, G., Jumas, B.E., Guigue, T.P., Allardet, S. A., O'Callaghan D. (1997). Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. *J Bacteriol*; 179 (10): 3244-9.
62. Moeini, Z.A., Pournajaf, A., Ferdosi, S.E., Gholami, M., Masjedian F., Khafri, S., Rajabnia, R. (2020). Comparison of loop-mediated isothermal amplification and conventional PCR tests for diagnosis of common *Brucella* species. *BMC Res Notes* 13, 533.
63. Morales, M.R., García N., Regalado, S.D., López, A., Contreras, A. (2014). Clinical, serological and polymerase chain reaction follow-up of a family with brucellosis. *Rev chilena Infectol*; 31 (4): 425-33.
64. Moreno E. (2014). Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis. *Front Microbiol*; 5 (213): 1-18.
65. Murray, P.R. (2012). What Is new in clinical microbiology: microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry: A paper from the 2011 William Beaumont Hospital symposium on molecular pathology. *J Mol Diagnostics*.;14(5):419–23.
66. Navarro, E., Casao, M.A., Solera, J. (2004). Diagnosis of human brucellosis using PCR. *Expert Rev Mol Diagn.*; 4: 115-23.
67. Nielsen, K. & Yu, W. (2010). Serological diagnosis of brucellosis. *Contributions, Sec. Biol. Med. Sci. MASA*. 31(1):65-89.
68. Nomura F. (2015). Proteome-based bacterial identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time offlight mass spectrometry (MALDITOF MS): revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology. *Biochim Biophys*;1854(6):528-37.

69. Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*;28: E63.
70. Nosaz, Z., Rasoulinejad, S., & Mousavi, G.S. (2020). Development of a DNA aptamer to detect *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* through cell SELEX. *Iranian journal of veterinary research*, 21(4), 294–300.
71. Secretaría de Salud. (2012) NORMA Oficial Mexicana NOM-022-SSA2-2012, Para la prevención y control de la brucelosis en el ser humano. Diario Oficial de la Federación.
72. Obregón, A.M., Muñoz, K., Echevarría, E., Rodríguez, Y., Rodríguez, J.E., Valdés, Y. (2015). Evaluación del sistema serológico Febrile Antigen *Brucella* para la pesquisa de anticuerpos contra brucelas, en Cuba. *Rev Cubana Med Trop.*;67(3).
73. Organización Mundial de la Salud. (29 de julio de 2020). Brucelosis. Organización Mundial de la Salud Recuperado el 12 de abril de 2021 de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/brucellosis>.
74. Organización Panamericana de la Salud. (2019). Tratamiento de las enfermedades infecciosas 2020-2022. Octava edición. Washington, D.C.
75. Ozbay, K., Inanmis, R.A. (2006). Successful treatment of brucellosis in a twin pregnancy. *Clin Exp Obstet Gynecol*; 33(1): 61-2.
76. Pappas, G., Papadimitrou, P., Akritidis, N. & Christou, L. (2006). The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect Dis*; 6: 91-99.
77. Peña, G.P., Gutierrez, A.A. (1996) Brucelosis. *Enfer Infecc Microbiol Clin*; 11:403-409.
78. Ponce de León, R.S., Lazcano, P.E., Rangel, F.M., Sosa, L.A., Huerta J.M. (2001). Bioterrorist: notes for an agenda in case of the unexpected. *Salud Publica Mex*; 43: 589-603.
79. Quevedo, P.M. (2007). epididimitis del carnero (*Brucella ovis*): diagnóstico comparativo entre inmunodifusión doble en gel de agar y contra inmuno electroforesis [Memoria para optar al Título Profesional de Médico Veterinario] Universidad de Chile.

80. Quintero, G., Calderón, A., Rodríguez, V., Barrios, C., Yasnot, M.F. (2014). Determinación de la seroprevalencia de anticuerpos para *Brucella abortus* en trabajadores de un frigorífico y ordeñadores en montería, córdoba (Colombia). Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 17(2): 333-340.
81. Rambow, A.A., Petersen, E.M., Gourley, C.R., Splitter, G.A. (2009). *Brucella* regulators: self-control in a hostile environment. Trends Microbiol; 17 (8): 371-7.
82. Reimer, L.G., Wilson, M.L., Weinstein, M.P. (1997). Update on detection of bacteremia and fungemia. Clin Microbiol Rev; 10: 444-465.
83. Robichaud, S., Libman, M., Behr, M., Rubin, E. (2004). Prevention of laboratory-acquired brucellosis. Clin Infect Dis; 38: e119-22.
84. Rodríguez, Z.M., Solera, S.J. (2014). Brucellosis. Medicine;11(52):3045-53.
85. Romero, C., Gamazo, C., Pardo, M., López, G.I. Specific detección of *Brucella* DNA by PCR. J. Clin. Microbiol 1995; 33(3): 615-17.
86. Sánchez, J.M., Ortiz, R.F., Castrillón, S.L., Giraldo, E.C., & Olivera, A.M. (2014). Aplicación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa para detección de *Brucella canis* a partir de muestras clínicas de caninos y humanos. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 27(1), 3-11.
87. Sánchez, V.A., Villarroel, N.R., Oviedo, B.A., Sandrea, G., Boscán, O.J., Pinto, P.R., Pirela, L.F., Becerra, R.L., & López, E. (2009). Monitoreo epidemiológico para *Brucella abortus* en fincas doble propósito del Municipio Machiques de Perijá, Venezuela: Parte II: Validez y seguridad de las pruebas anillo de la leche y rosa de bengala. Revista Científica, 19(5), 466-474.
88. Sbriglio, J.L., Sbriglio, H., Sainz, S. (2007). Brucellosis. Revista Bioanálisis: 19-22.
89. Serra, J., Velasco, J., Godoy, P., Mendoza, J. (2001). ¿Puede sustituir la prueba de Brucellacapt® a la prueba de Coombs en el diagnóstico de la brucelosis humana? Enferm Infecc Microbiol Clin.; 19 (5): 202-205.
90. Scholz, H.C., Hubalek, Z., Sedláček, I., Vergnaud, G., Tomaso, H., Al Dahouk S. (2008). *Brucella microti* sp. nov. isolated from the common vole *Microtus arvalis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology; 58 (2): 375-82.

91. Scholz, H.C., Nockler, K., Gollner, C., Bahn, P., Vergnaud, G., Tomaso, H. (2010). *Brucella inopinata* sp. nov., isolated from a breast implant infection. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 60 (4): 801-8.
92. Scholz, H.C., Revilla-Fernández, S., Dahouk, S.A., Hammerl, J.A., Zygmunt, M.S., Cloeckaert, A., Koylass, M., Whatmore, A.M., Blom, J., Vergnaud, G., Witte, A., Aistleitner, K., Hofer, E. (2016). *Brucella vulpis* sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (*Vulpes-vulpes*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*; 66, 2090-2098.
93. Seco-Mediavilla, P., Verger, J.M., Grayon, M., Cloeckaert, A., Marin, C.M., Zygmunt, M.S. (2003). Epitope mapping of the *Brucella melitensis* BP26 immunogenic protein: usefulness for diagnosis of sheep brucellosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10(4): 647-51.
94. Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología y Sistema Nacional de Vigilancia epidemiológica. (2019). Vigilancia Epidemiológica Semana 52. Boletín epidemiológico; 52 (36); 33-33.
95. Secretaría de Salud, Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, Dirección Nacional de Epidemiología. (2012) Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Brucelosis; 1:1-47.
96. Segura JC. Brucelosis. Guías Clínicas 2005; 5(25): 1-6.
97. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2020). *Población ganadera*. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Recuperado el 24 de mayo de 2021, de: <https://www.gob.mx/siap/documentos/poblacion-ganadera-136762>
98. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2019). *Boletín de leche*. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Recuperado el 24 de mayo de 2021, de: <https://www.gob.mx/siap/documentos/boletin-de-leche?state=draft>
99. Skalsky, K., Yahav, D., Bishara, J., Pitlik, S. (2008). Treatment of human brucellosis: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *BMJ*; 25(1): 1-8.
- 100.
101. Skendros, P., Boura, P. (2013). Immunity to brucellosis. *Rev Sci Tech*; 32 (1): 137-47.
102. Spiridonova, V.A. (2010). *Biochemistry (Moscow) supplement series B: Biomed. Chem.* 4; 138.

103. Stemshorn, B., Nielsen, K. (1981). The bovine immune response to *Brucella abortus* IV. Studies with a double immunodiffusion test for antibody against A2. *Can J Comp Med*; 45(2): 147-53.
104. Suárez, G.F., Arellano, R.B., Díaz, A.E. (2009). Brucellosis: Importancia en la salud pública y el ámbito pecuario, su control y diagnóstico. *FMVZ UNAM CENID Microbiología INIFAP SAGARPA*; 1:1-12.
105. Swai, E.S., Schoonman, L. (2009). Human brucellosis: seroprevalence and risk factors related to high-risk occupational groups in Tanga Municipality, Tanzania. *Zoonoses Public Health*; 56: 183-7.
106. Tawfiq, J.A. (2008). Therapeutic options for human brucellosis. *Expert Rev Anti Infect Ther*; 6(1): 109-20.
107. Traxler, R.M., Lehman, M.W., Bosserman, E.A., Guerra, M.A., Smith, T.L. (2013). A literature review of laboratory-acquired brucellosis. *J Clin Microbiol*; 51 (9): 3055-62.
108. Tsou, T.P., Mu, J.J. (2012). Brucellosis: a neglected but existing threat to travelers and laboratory personnel in Taiwan. *J Formos Med Assoc*; 11 (7): 353-4.
109. Vassallo D. (1992). The corps disease: brucellosis and its historical association with the Royal Army Medical Corps. *J R Army Med Corps*; 138 (3): 140-50.
110. Vega, C.A., Ariza, A.R. & Rodríguez, W.F. (2008). Brucellosis. Una infección vigente. *Acta Med.*; 6:158-65.
111. Whatmore, A.M., Davison, N., Cloeckert, A., Al Dahouk, S., Zygmunt, M.S., Brew, S.D. (2014). *Brucella papionis* sp. nov. isolated from baboons (*Papio* spp.) *Int J Syst Evol Microbiol*; 64 (12): 4120-8.
112. Wyatt H. (2013). Lessons from the history of brucellosis. *Rev Sci Tech*; 32 (1): 17-25.
113. Yagupsky, P. (1999). Detection of *Brucella* in blood cultures. *J Clin Microbiol*; 37:3437-3442.
114. Young, E. J. (1990). Serologic diagnosis of human brucellosis: Analysis of 214 cases by agglutination tests and review of the literature. *Rev. Infect. Dis.*13:359-372.

^a La diferenciación de las especies se hace en agar-tripticosa-soja o en agar-triptosa con la siguiente gama de diluciones del colorante: a) 1:25 000; b) 1:50 000; c) 1 :100 000. Las pruebas con cepas que requieren CO₂, de ben hacerse en una atmósfera enriquecida con ese gas; las demás se realizan en atmósfera normal.

^b Aglutinación de suero: A = suero monoespecífico de *B.abortus*; M = suero monoespecífico de *B.melitensis*; R = suero anti *Brucella* de especies rugosas.

^c Tb: Prueba de bacteriófagos Tbilisi.

DPO = dilución para pruebas ordinarias.

^d + (-): Prueba generalmente positiva, pero pueden encontrarse variedades negativas, por ejemplo, la cepa 19.

^e El biotipo 544 es atípico por carecer de actividad ureasica.

^f Para el cultivo de *B. abortus* biotipo 2 y *B. ovis* es preciso añadir 5% de suero al medio de base.

Recuperado de: Alton, G.G., Jones, L.M., Pietz, D.E. (1976). Las técnicas de laboratorios en la brucelosis. 2^{da} Ed. Ginebra: FAO y OMS.

12.2. Resumen

Feusier y Meyers en 1920, nombraron al género *Brucella* en honor a David Bruce, microbiólogo y patólogo escocés que identificó al microorganismo, por primera vez en 1887, causante de la fiebre de Malta (Wyatt, 2013) conocida hoy comúnmente como brucelosis. La patogenicidad y virulencia de *Brucella* están determinadas por los componentes de la membrana externa de la célula bacteriana: el lipopolisacárido (LPS) antígeno inmunodominante y las proteínas de membrana externa, lo que le confieren su capacidad de residir dentro de células fagocíticas y no fagocíticas, aunque también puede sobrevivir fuera de las células, por lo que se le considera una bacteria intracelular facultativa (Atluri et al., 2011). Las especies lisas son las más infectivas para el hombre son principalmente *B. melitensis* y *B. abortus* (Suárez et al., 2009). Desde las primeras dos semanas se pueden detectar anticuerpos contra *Brucella* spp., siendo del tipo IgM, IgG e IgA (Skendros & Boura, 2013).

El diagnóstico de la Brucelosis debe basar en la historia clínica del paciente, sobre todo si existió contacto con animales enfermos, si visitó una zona endémica e ingirió derivados lácteos no pasteurizados (Mantur et al., 2016). Este se establece a través de métodos indirectos a partir de muestras serológicas, evidenciando anticuerpos específicos contra *Brucella* presentes en los pacientes, posteriormente se deberá confirmar la presencia de *Brucella* spp. mediante métodos directos como el hemocultivo. En México y aún no se han realizado actualizaciones importantes en las metodologías normalizadas para la prevención y control de la brucelosis en el ser humano. En los últimos 10 años se han desarrollado metodologías importantes que podrían ayudar a mejorar el diagnóstico y la elección de un tratamiento por parte del personal médico. Por lo que se realizó una revisión y recopilación bibliográfica de las pruebas de laboratorio utilizadas en el diagnóstico de brucelosis en humanos que puedan ayudar a mejorar el diagnóstico de la brucelosis, esta investigación podrá servir para actualizar los programas de capacitación del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos InDRE y de otras instituciones de interés.

Se encontró que en México principalmente se utiliza la aglutinación con Rosa de Bengala la cual es una prueba presuntiva muy económica, con una aproximación diagnóstica en pocos minutos y con una sensibilidad entre el 95 al 99%, (Méndez et al. 2013) Sin embargo presenta una baja especificidad, por lo que un resultado positivo plantea varios escenarios: desde una infección activa hasta anticuerpos persistentes después de la recuperación (Rentaría et al., 2005; Roger et al., 2005), por lo que se debe realizar una confirmación con las pruebas aceptadas como SAT y 2-ME que determinen el título y tipo de anticuerpos presentes (Secretaría de Salud, 2012). Por otro lado, estas pruebas no son útiles en períodos iniciales de la enfermedad o en casos de brucelosis crónica, ya que no se conoce con certeza el tiempo de la eliminación de *Brucella* y tampoco existe un criterio seguro de cura de la enfermedad (Alsubaje et al., 2005; Guzmán et al., 2016).

En casos de brucelosis crónica se recomienda realizar la prueba de Coombs o Brucellacapt®, las cuales detecta anticuerpos IgG incompletos o no aglutinables (Sbriglio & Sainz, 2007). Ambas pruebas en estudios comparativos han demostrado

contar con una alta sensibilidad y especificidad, llegando a ser del 100% y 80% para prueba de Coombs y del 95% y 74% para Brucellcapt®. Usando esta última, cuando se obtienen sueros con títulos desde 40 y hasta 160 se consideraron reactivos a brucelosis (Obregón et al., 2015).

La prueba de ELISA permite detectar y cuantificar los anticuerpos IgG, IgM e IgA (completos e incompletos) contra *Brucella* con una sensibilidad y especificidad muy cercana a 100% (Ellie, 2018), lo que la vuelve un método diagnóstico más sensible y específico que las demás pruebas serológicas, por lo que se recomienda en áreas endémicas y en individuos con recidivas de la enfermedad (Vega et al., 2008).

La técnica de FPA tiene las ventajas de realizarse en pocos minutos, poder ser ejecutada fuera del laboratorio de diagnóstico utilizando un analizador portátil y de poseer una sensibilidad entre 98,1 y 99,02% y una especificidad entre 99,8 y 100% (Nielsen & Yu, 2010), aunque algunos autores recomiendan seguir usando ELISA hasta que la FPA sea adecuadamente estandarizada para el diagnóstico de brucelosis humana (Quintero et al., 2014).

El cultivo y aislamiento de *Brucella* spp. nos otorga el diagnóstico definitivo y la identificación de la especie y biovar (Álvarez, Díaz & Ortiz, 2015). Pero a pesar de su alta especificidad, la sensibilidad de la detección varía de 15% a 70% en los pacientes con infección aguda y es incluso menor en los pacientes con infección crónica (Seleem et al., 2010).

El desarrollo de pruebas moleculares constituye una importante alternativa para el diagnóstico. La prueba PCR en tiempo real aplicada a sangre periférica de pacientes con brucelosis, detecta específicamente al género *Brucella* y puede alcanzar una sensibilidad del 100% y especificidad del 80.23% comparada con el hemocultivo (Álvarez et al., 2015), lo que sería útil en pacientes que presentan un curso clínico complicado cuyos cultivos son negativos en los medios habituales y en aquellos laboratorios que dispongan de la infraestructura necesaria para su realización.

El método LAMP es factible para la detección de *Brucella* spp. a partir de muestras de sangre y ha demostrado tener una sensibilidad hasta 10 veces mayor comparada

con la PCR convencional (Chen et al., 2013; Moeini et al., 2020), sin embargo, esta prueba, aunada a las pruebas MALDI-TOF, Aptameros y la secuenciación de nueva generación presentadas en este documento, continúan siendo técnicas nuevas utilizada para la detección de *Brucella* spp., por lo que será necesario que otros grupos corroboren su eficacia y se defina con precisión la metodología más apropiada para su utilización.

Es importante la participación del sector de salud pública en la divulgación a la población sobre cómo evitar el contagio de *Brucella* spp. así como de la sintomatología más común que se presenta una vez infectado el paciente. Esto podría disminuir el tiempo en el que acudan a los centros de salud, lo que podría mejorar el diagnóstico y la elección de un tratamiento por parte del personal médico.

Se recomienda realizar una revisión bibliográfica que incluya los equipos automatizados con metodologías validadas, que han surgido a partir de las nuevas tecnologías para el diagnóstico de brucelosis.

Vo.Bo. de los Asesores:



Q.B.P. Eduardo Jiménez Sánchez
Ced. Profesional: 10571361



M. en C. Felipe Mendoza Pérez
No. Económico: 7183